

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA I



TESIS DOCTORAL

**INHIBIDORES DE FOSFODIESTERASAS COMO
POTENCIALES FÁRMACOS PARA EL TRATAMIENTO DE
ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS**



Ana María García Fernández

Madrid 2015

La presente Tesis Doctoral se ha realizado en el Instituto de Química Médica y el Centro de Investigaciones Biológicas, bajo la dirección de la Dra. Carmen Gil y la Dra. Ana Martínez, gracias al programa JAE Predoc del CSIC, al cual agradezco su apoyo para la realización de este trabajo.

Agradezco también al DAAD la beca que me otorgó gracias a la que realicé una estancia de 5 meses en el grupo del Prof. Bräse en el Karlsruhe Institute of Technology (Alemania).

“Aprender a volar significa amar el viento”

A mis padres y hermanas

AGRADECIMIENTOS

Los comienzos nunca fueron fáciles...los finales creo que tampoco lo son. Quiero dar desde aquí las gracias a todos aquellos que en algún momento o de alguna manera han contribuido a que se haya podido desarrollar este trabajo, a veces sin saberlo, y sobre todo a los que con su sonrisa y cariño han hecho de este camino algo agradable y divertido, gratificante, un continuo aprendizaje.

Ana y Carmen, muchísimas gracias por haberme abierto las puertas de vuestro laboratorio y haberme dado la oportunidad de aprender tantas cosas y de hacerlo de una manera tan agradable, por tratarnos siempre como una gran familia, por haberme apoyado en todo e incluso por vuestra visita a Alemania. Carmen, muchísimas gracias por enseñarme tu buen hacer y por transmitir tu constancia en el trabajo diario, por tu disposición SIEMPRE, y por todos los consejos en los días grises; también gracias a ti tuve la oportunidad de trabajar en AK Bräse, y disfrutar de un tiempo estupendo allí. Ana, gracias por transmitir siempre esa motivación y alegría, por hacer que nos contagiemos de tus ganas de trabajar y de luchar por lo que nos gusta, por enseñarme a ver los resultados “negativos” como una lección para mejorar, para aprender. Grandes científicas y mejores personas. Me alegro muchísimo de haber pertenecido a vuestro grupo de trabajo, ha sido un placer.

A los doctores Santiago Conde y Maribel Rodríguez, por haberme acogido en sus laboratorios. A todos los que han compartido el día a día de estos años conmigo (Dani, Placi, Valle, Miriam, Leti, Silvain, Mario, Martín, Irene, Felipe, Jose, Josefa, Victor,...), porque me ha encantado trabajar con vosotros, en un ambiente tan bueno y divertido. Dani, gracias por tu gran paciencia, por los buenos ratos que hemos pasado en el labo, seguro que pronto serás un científico titular estupendo. Valle, gracias por todos los consejos en mi primer año por el IQM y ahora desde la distancia. Miriam, por todo lo que he aprendido de ti y lo bien que lo hemos pasado. Irenita, que te voy a decir a ti, ya una pedazo de postdoc, gracias por acogerme en el 301, me han encantado las meriendas y las cenas que hemos compartido, por enseñarme a hacer trapillo jeje. Josefa, mi niña que siempre transmite ese optimismo y esas ganas de vivir, por mostrar tu sonrisa todos los días y por ayudarme en todo, ¡vas a llegar muy lejos! Placi, los comienzos contigo fueron fantásticos, gracias. Silvi, gracias por tu ayuda con la química. Jose, gracias por lo que he aprendido de ti y por ser tan divertido. Felipe, gracias por estar siempre dispuesto, por enseñarme a pasármelo bien haciendo química, y aunque no lo creas gracias por hacerme sonreír con todo lo que te has metido conmigo. Víctor, que después de la JAE-intro, le hemos caído bien y volvió para ser todo un “chico parásitos”, ¡ánimo con tu tesis! Elisa, ánimo a ti también, mucha suerte! A Nuria, muchísimas gracias por todo lo que me

has ayudado, por tu disponibilidad siempre. A todos los de las comidas del IQM (Martita, Bea, Nieves, Pili, Luismi, Andrés, Aída, Lole,...), gracias por todo lo que hemos compartido. A todos los chicos del laboratorio del CIB (Noelia, Myriam, Anna, Carlos, Carmen, Talita, Loreto, Cristina, Sara,...), gracias a todos por haberme aguantado en la recta final de este trabajo y por lo bien que me lo he pasado con vosotros, sois geniales, esas comidas y esas hamburguesas de viernes no serían lo mismo, os deseo todo lo mejor. Ruth, por tu ánimo en la recta final. Helena, que pronto serás una gran arquitecta. María, mi pequeña compi, muchas gracias por todo.

A todos aquellos que han contribuido a que este trabajo salga adelante. Muchas gracias al personal de RMN (May, Araceli, Elisa, Pablo,...), a Tico por tantos microanálisis, a Guada y Felipe de HPLC-MS. A todos los responsables de los ensayos enzimáticos (grupo de Santiago de Compostela y Concha), ensayos celulares (Dr. José Morales y Dra. Ana Pérez), ensayos *in vivo* (Dra. Olga Valverde y Dra. Guadalupe Mengod).

Al Profesor Javier Luque y todo su equipo, por haberme permitido trabajar en su grupo, y por haber despertado mi interés en la química computacional. En especial a mi Anita, por esos meses tan buenos que pasamos juntas, por esas noches de puff y vinito.

Thanks to Prof. S. Bräse, and to Dr. N. Jung, for having hosted me in their research group and have given me the opportunity to develop part of this PhD work. Thanks to my colleagues from AK Bräse, and especially to Larissa, for her help during my time there in Germany, and for being a really good friend. Danke schön!

A las personas más importantes de mi vida, mis padres, porque sin haber estudiado una carrera y sin saber exactamente qué hago en el laboratorio, han sabido ayudarme como solo unos padres saben hacerlo, me han ofrecido su apoyo y ayuda siempre. Mamá, por ser la persona más fuerte de espíritu que conozco y por confiar en mí siempre. Papá, por haberme enseñado el valor del trabajo y el esfuerzo, por querer lo mejor para mí. A las dos niñas de la casa, Noelia y Alicia, gracias pequeñas por estar siempre ahí. Noelia, muchísimas gracias por tus consejos, por hacerme ver las cosas positivas de los momentos malos, eres muy grande. Alicia, mi Alo favorito, porque solo con sentir tu abrazo todo se ve de otro color, gracias por tu apoyo y tus palabras. A toda mi familia, en especial a mi abuela Lola, por haber sido como una segunda madre para mí; a mi tía Pepi, por estar siempre ahí y quererme tanto, y a los nenes de la casa, que son como dos hermanitos más; a Luisi y Chon, por cuidarme y compartir tanto conmigo; a mi abuelo Pedro, por interesarse siempre por mi trabajo; a mi prima Mari Carmen por su apoyo y

cercanía; muchísimas gracias de todo corazón. A Luisa, Juan Carlos, Elena y Jorge, por quererme como una más en su casa, espero seguir contando siempre con vosotros.

A mis “membris” (Gema, Isa, Sonia, Teresa, Fran, Esther, Noel, Fani, Teresilla), que aunque piensan que los químicos hacemos cosas raras, siempre me han apoyado en todo y me han alegrado el fin de semana, el verano... por todas barbacoas y piticlínes que nos quedan por compartir. En especial, a Gema, Isa y Sonia, por quererme tal como soy, porque sin ellas no habría llegado hasta aquí, sé que puedo confiar siempre en vosotras chicas. Esther, gracias por tu brillante idea, aunque tú no lo creas.

A mis químicos, con los que he compartido tantas andanzas. María, mi princesa, por todos los fines de semana culipardos, por tus consejos y tu alegría, aunque ahora estés lejos. A Joseju, porque eres muy grande, gracias a ti llegué aquí y lo sabes, no podré agradecerte nunca lo suficiente...ánimo con tu recta final! A Antonio, por todos los viajes en la bala roja, eres un gran trabajador y amigo. Y a Paqui, que aunque no es química, siempre será una de las mejores conquistas en mis años de carrera, gracias por todo pequeña.

Y como no, al químico que más ha sufrido este trabajo, al que más le he dado la lata estos años. Gracias Dani por haberme ayudado muchísimo con todo esto, porque a pesar de lo lejos que estamos en esta última etapa has sabido estar ahí. Gracias por compensar mi nerviosismo con tu paciencia y por todos tus consejos, por ser como eres.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| 1. NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS Y SEÑALIZACIÓN | 11 |
| 2. FOSFODIESTERASAS | 12 |
| 2.1. Estructura | 13 |
| 3. FOSFODIESTERASAS COMO DIANAS TERAPÉUTICAS | 16 |
| 3.1. Enfermedades neurodegenerativas y PDEs | 18 |
| 3.1.1. Fosfodiesterasa 7 | 22 |
| 3.1.1.1. Inhibidores de fosfodiesterasa 7 | 23 |
| 3.1.2. Fosfodiesterasa 8 | 26 |
| 3.1.2.1. Inhibidores de fosfodiesterasa 8..... | 27 |
| 3.1.3. Fosfodiesterasa 10 | 28 |
| 3.1.3.1. Inhibidores de fosfodiesterasa 10 | 30 |
| OBJETIVOS | 35 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 39 |
| 1. FOSFODIESTERASA 7 COMO DIANA TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS | 41 |
| 1.1. Antecedentes | 41 |
| 1.2. Derivados de tioxoquinazolina | 43 |
| 1.2.1. Diseño de nuevos derivados de tioxoquinazolina S-alquilados | 43 |
| 1.2.2. Síntesis de los nuevos derivados de tioxoquinazolina empleando MAOS | 44 |
| 1.2.3. Evaluación enzimática | 46 |
| 1.2.4. Predicción del paso de barrera hematoencefálica | 47 |
| 1.2.5. Evaluación de los nuevos derivados de tioxoquinazolina en un modelo <i>in vitro</i> de la enfermedad de Parkinson | 50 |
| 1.2.6. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los nuevos derivados de tioxoquinazolina | 52 |

| | |
|---|----|
| 1.2.7. Evaluación de la eficacia <i>in vivo</i> de los derivados de tioxoquinazolina S-alquilados en un modelo de esclerosis múltiple.... | 54 |
| 1.3. Derivados de diarilsulfuro | 55 |
| 1.3.1. Cribado fenotípico para identificar nuevos cabezas de serie para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson | 55 |
| 1.3.2. Optimización del prototipo identificado: desarrollo de una nueva familia de inhibidores de PDE7 | 58 |
| 1.3.3. Evaluación enzimática y estudio del modo de unión | 66 |
| 1.3.4. Evaluación del perfil de selectividad de los inhibidores seleccionados | 70 |
| 1.3.5. Efecto de la inhibición de PDE7 en los niveles de AMPc..... | 72 |
| 1.3.6. Predicción del paso de barrera hematoencefálica | 73 |
| 1.3.7. Evaluación de los nuevos derivados de diarilsulfuro en un modelo <i>in vitro</i> de la enfermedad de Parkinson | 73 |
| 1.3.8. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antiinflamatoria de los nuevos derivados de diarilsulfuro | 74 |
| 1.3.9. Estudio del efecto emetogénico <i>in vivo</i> de los inhibidores de PDE7 | 75 |
| 1.4. Oxidación química de los derivados de diarilsulfuro | 77 |
| 1.5. Evaluación enzimática de los productos de oxidación | 87 |
| 1.6. Oxidación metabólica <i>in vitro</i> de los derivados de diarilsulfuro | 88 |

| | |
|--|-----------|
| 2. IDENTIFICACIÓN Y DESARROLLO DE NUEVOS INHIBIDORES DE PDE10A PARA SU ESTUDIO EN MODELOS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON | 93 |
| 2.1. Introducción | 93 |
| 2.2. Identificación de nuevos prototipos mediante cribado virtual en el centro activo de la enzima | 94 |
| 2.2.1. Derivados de tioxoquinazolina como inhibidores de PDE10A | 100 |
| 2.2.2. Desarrollo de nuevos derivados de imidazol a partir de los cabezas de serie identificados | 106 |
| 2.2.2.1. Imidazoles 2,4,5-trisustituídos: estudio del modo de unión, síntesis de nuevos derivados y evaluación enzimática | 109 |
| 2.2.2.2. Imidazoles 4,5-disustituídos: estudio del modo de unión, síntesis de nuevos derivados y su evaluación enzimática | 115 |
| 2.2.2.3. Predicción del paso de barrera hematoencefálica | 117 |

| | |
|---|------------|
| 2.2.2.4. Evaluación de los nuevos derivados de imidazol en un modelo <i>in vitro</i> de la enfermedad de Parkinson | 118 |
| 2.2.2.5. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antiinflamatoria de los nuevos inhibidores de PDE10A | 119 |
| 2.2.2.6. Evaluación en modelos <i>in vivo</i> de la enfermedad de Parkinson ... | 120 |
| 2.2.3. Búsqueda de moduladores alostéricos de PDE10A basados en la estructura del dominio regulador GAF | 122 |
| 3. DISEÑO DE INHIBIDORES DE PDE8 Y OBTENCIÓN DE NUEVOS DERIVADOS DE 3-ACILINDAZOL MEDIANTE TÉCNICAS DE SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA | 127 |
| 3.1. Introducción | 127 |
| 3.2. Diseño de nuevos inhibidores de fosfodiesterasa 8 | 127 |
| 3.3. Síntesis en fase sólida de derivados de 3-acilindazol | 129 |
| 3.4. Evaluación enzimática de los nuevos derivados sintetizados | 141 |
| CONCLUSIONES | 143 |
| DIFUSIÓN DE RESULTADOS | 147 |
| PARTE EXPERIMENTAL | 151 |
| 1. PROCEDIMIENTOS QUÍMICOS | 153 |
| 1.1. Técnicas y aparatos | 153 |
| 1.2. Síntesis de derivados de tioquinazolina | 154 |
| 1.2.1. Síntesis de tioquinazolinas | 154 |
| 1.2.2. Síntesis de tioquinazolinas S-alquiladas | 156 |
| 1.3. Síntesis de derivados de sulfuro | 163 |
| 1.4. N-acetilación de derivados de sulfuro | 186 |
| 1.5. Reducción de nitroderivados de sulfuro | 187 |
| 1.6. Síntesis de derivados de sulfóxido y sulfona | 188 |
| 1.7. Síntesis del N-óxido de 4-[(2-Cloro-4-nitrofenil)sulfinil]piridina..... | 190 |
| 1.8. Síntesis de derivados de imidazol | 190 |
| 1.8.1. Síntesis de imidazoles trisustituídos | 190 |
| 1.8.2. Síntesis de imidazoles N-alquilados | 194 |

| | |
|---|------------|
| 1.9. Síntesis en disolución de <i>N</i> -[7-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -indazol-3-il]benzamida..... | 196 |
| 1.10. Síntesis en fase sólida de derivados de indazol/benzotriazina | 199 |
| 1.10.1. Síntesis de <i>N,N</i> -isopropilpoliestirilmetilamina | 199 |
| 1.10.2. Síntesis de las resinas funcionalizadas con el conector T1 | 199 |
| 1.10.3. Obtención de los productos de desanclaje de las resinas de triazeno | 209 |
| 2. PROCEDIMIENTOS BIOLÓGICOS | 217 |
| 2.1. Predicción de la capacidad de penetración en el sistema nervioso central | 217 |
| 2.2. Estudio de la oxidación metabólica <i>in vitro</i> de los derivados de diarilsulfuro 48 y 73 | 218 |
| 3. PROCEDIMIENTOS COMPUTACIONALES | 219 |
| 3.1. Preparación de las estructuras químicas de los ligandos | 219 |
| 3.2. Preparación de la estructura de las proteínas | 220 |
| 3.3. Cribado virtual | 220 |
| 3.3.1. Cribado virtual sobre el dominio catalítico de PDE10A..... | 220 |
| 3.3.2. Cribado virtual sobre el dominio GAF de PDE10A | 221 |
| 3.4. Docking focalizado sobre PDE7A y PDE10A | 221 |
| 3.5. Análisis comparativo del modo de unión de los derivados de imidazol y maleidimida | 222 |
| 3.6. Determinación de las cavidades en la superficie del dominio catalítico de PDE10A | 222 |
| ABSTRACT | 223 |

ABREVIATURAS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

AcONa: acetato de sodio

ADME: absorción, distribución, metabolismo y excreción.

Ala: alanina

iAmONO: nitrito de isoamilo

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

Ar: sustituyente aromático

ASDS: degeneración estriatal autosómica dominante

Asp: aspártico

Asn: asparagina

BHE: barrera hematoencefálica

c: cuádruplete

CaM: unión a calmodulina

°C: grados centígrados

CI₅₀: concentración inhibitoria 50

CK1: caseína quinasa 1

COSY: del inglés *correlation spectroscopy*

CREB: del inglés *cAMP-responsive element binding*

¹³C-RMN: resonancia magnética nuclear de carbono 13

Cy: ciclohexilo

CYP450: citocromo P450

Cys: cisteína

d: doblete

DCC: *N,N'*-díciclohexilcarbodiimida

dd: doble doblete

Ddd: doblete de doble doblete

DMAP: 4-dimetilaminopiridina

DMF: *N,N*-dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

EAE: encefalomiелitis autoinmune experimental

EM: espectrometría de masas

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

Equiv: equivalente

ESI: del inglés *electrospray ionization*

Et: etilo

Et₃N: trietilamina

EtOH: etanol

GAF: del inglés *cGMP-activated PDEs, adenylyl cyclase, and Fh1A*

GFAP: proteína fibrilar ácida de la glía

Gln: glutamina

GMPc: guanosín monofosfato cíclico

GSK-3: glucógeno sintasa quinasa 3

Glu: glutámico

Gly: glicina

³H-AMPc: adenosín monofosfato cíclico tritiado

¹H-RMN: resonancia magnética de protón

HMBC: del inglés *heteronuclear multiple bond correlation*

HSQC: del inglés *heteronuclear single quantum coherence*

Hz: Hertzios

IE: impacto electrónico

IL: interleuquina

Ile: isoleucina

IR: espectroscopía infrarroja

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HPLC-MS: HPLC acoplada a un espectrómetro de masas

J: constante de acoplamiento

Leu: leucina

LPS: lipopolisacárido

LRRK2: del inglés *leucine rich repeat kinase 2*

Lys: lisina

m: multiplete

MAOS: síntesis orgánica asistida por microondas

Me: metilo

MeOH: metanol

Met: metionina

MHz: megahertzios

MTT: bromuro de 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolio

MW: microondas

NADPH: nicotinamida adenina nucleótido fosfato

Naph: naftilo

NOS: especies reactivas de nitrógeno

ORAC: del inglés *oxygen radical absorbance capacity*

PAMPA: del inglés *parallel artificial membrane permeability assay*

PAS: del inglés *period, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator and single minded*

PBL: del inglés *porcin brain lipid*

PBS: tampón fosfato salino

PDB: del inglés *Protein data bank*

PDE: fosfodiesterasa

Pe: permeabilidad efectiva

PET: tomografía de emisión de positrones

P.f.: punto de fusión

Ph: fenilo

Phe: fenilalanina

PKA: proteína kinasa A

PM: peso molecular

Ppm: partes por millón

Pro: prolina

Py: piridina

REC: del inglés *receiver*

ROCK: del inglés *rho-associated protein kinase*

ROS: especies reactivas de oxígeno

s: singlete

sa: singlete ancho

sept: septuplete

Ser: serina

Sext: sextuplete

SNC: sistema nervioso central

SNpc: del inglés *substantia nigra pars compacta*

t: triplete

t.a.: temperatura ambiente

td: triplete de dobletes

TFA: ácido trifluoroacético

TH: tirosina hidrolasa

THF: tetrahidrofurano

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

Trp: triptófano

tt: triple triplete

Tyr: tirosina

UCR: del inglés *upstream conserved regions*

INTRODUCCIÓN

1. NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS Y SEÑALIZACIÓN

La transducción de señales es un proceso fundamental y básico para todos los seres vivos. En nuestro organismo contamos con un gran número de vías de señalización celular encargadas de proporcionar ante un estímulo externo concreto, una respuesta fisiológica determinada. El término “segundo mensajero” hace alusión a toda sustancia intracelular que regula la actividad de la célula mediante la transmisión de la señal recibida de una molécula extracelular (hormona o neurotransmisor), que se une a un receptor presente en la superficie de la célula. Esta definición engloba moléculas como adenosín 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc)¹, guanosín 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc)², diacilglicerol³ y calcio⁴, entre otras. Por simple que pueda parecer el mecanismo de acción de estas moléculas, esconde procesos muy complejos gracias a los cuales su acción es capaz de controlar muchas funciones diferentes en nuestro organismo.

El AMPc en concreto fue aislado por primera vez por los americanos Earl Wilbur Sutherland y Theodore W. Rall en 1956⁵. Pero el concepto de segundo mensajero no empezó a manejarse hasta que, en 1957, se descubrió que la acción sobre el metabolismo hepático de la adrenalina y el glucagón estaba mediada por este nucleótido⁶, y es más, este término no se aceptó abiertamente hasta que Lipkin y colaboradores determinaron su síntesis y estructura hacia 1958⁷. Diez años más tarde, en 1968, Edwin G. Krebs aclaró la transmisión de la información en el interior de las células al encontrarse que la adrenalina, via AMPc, era capaz de estimular una cascada de quinasas, siendo la primera de ellas una fosforilasa-quinasa quinasa⁸. Por otro lado, poco después de su descubrimiento, se observó que los nucleótidos cíclicos eran inestables en los tejidos aislados, conduciendo a la identificación de la actividad enzimática responsable de esta destrucción¹: Sutherland atribuyó de manera acertada esta actividad a una enzima

¹ Robinson, G.A. “Cyclic AMP as a second messenger” *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **1970**, 10, 55-74.

² Goodman, M.G.; Weigle, W.O. “Activation of lymphocytes by brominated nucleoside and cyclic nucleotide analogues: implications for the “second messenger” function of cyclic GMP” *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1981**, 78, 7604-7608.

³ Bell, R.M.; Hannun, Y.A.; Loomis, C.R. “Mechanism of regulation of protein kinase C by lipid second messengers” *Symp. Fundam. Cancer Res.* **1986**, 39, 145-156.

⁴ Rasmussen, H.; Jensen, P.; Lake, W.; Goodman, D.B. “Calcium ion as second messenger” *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **1976**, 5, Suppl. 11S-27S.

⁵ Rall, T.W.; Sutherland, E.W.; Wosilait, W.D. “The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase: III. Reactivation of liver phosphorylase in slices and in extracts” *J. Biol. Chem.* **1956**, 218, 483-495.

⁶ Rall, T.W.; Sutherland, E.W.; Berthet, J. “The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase: IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates” *J. Biol. Chem.* **1957**, 224, 463-475.

⁷ Lipkin, D.; Cook, V.H.; Markham, R. “Adenosine-3',5'-phosphoric acid: a proof of structure” *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 6198-6203.

⁸ Walsh, D.A.; Perkins, J.P.; Krebs, E.G. “An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle” *J. Biol. Chem.* **1968**, 243, 3763-3765.

dependiente de Mg^{2+} , que rompía el enlace fosfodiéster de la posición 3' del nucleótido, razón por la que se denominó fosfodiesterasa (PDE).

Fue el posterior descubrimiento del GMPc y los avances en los protocolos de separación de proteínas⁹, lo que hizo obvia la existencia de múltiples isoformas de PDE que coexistían dentro de la misma célula, con diferentes afinidades por AMPc, GMPc y sensibilidad hacia distintos inhibidores. Posteriormente, con el desarrollo de las técnicas de secuenciación de proteínas y de clonación molecular, se ha pasado del conocimiento de 3 isoenzimas en esta familia, tal y como Weishaar y colaboradores recogieron en una revisión en el año 1985¹⁰, a identificar la existencia de los 21 genes que codifican para las 11 familias de fosfodiesterasas humanas conocidas hasta la fecha, los cuales dan lugar a las cerca de 100 proteínas que forman esta superfamilia¹¹ (**figura 1**). Por otro lado, cabe indicar que las enzimas encargadas de la síntesis del AMPc y el GMPc son la adenilato ciclasa y la guanilato ciclasa, respectivamente.

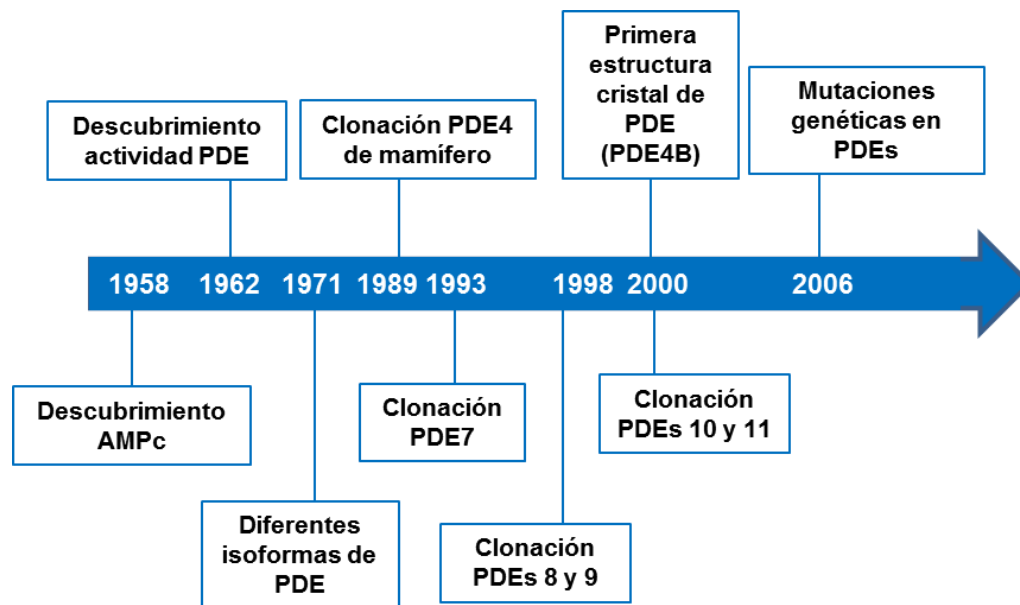


Figura 1. Avances en el campo de las fosfodiesterasas desde su descubrimiento.

2. FOSFODIESTERASAS

Las fosfodiesterasas son una familia de metaloproteínas y, como su nombre indica, hidrolizan el enlace fosfodiéster que conduce a la transformación de los nucleótidos

⁹ Thompson, W.J.; Appleman, M.M. "Control mechanisms and biochemical genetics: Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat tissues" *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 3145-3150.

¹⁰ Weishaar, R.E.; Cain, M.H.; Bristol, J.A. "A new generation of phosphodiesterase inhibitors: multiple molecular forms of phosphodiesterase and the potential for drug selectivity" *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 537-545.

¹¹ Conti, M; Beavo, J. "Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling" *Ann. Rev. Biochem.* **2007**, 76, 481-511.

cíclicos AMPc y GMPc en sus formas inactivas 5'-monofosfato de adenosina (5'-AMP) y 5'-monofosfato de guanosina (5'-GMP), respectivamente. Se clasifican en 11 grupos (PDE1-11), en función de la especificidad de sustrato, las propiedades cinéticas, la sensibilidad a diferentes inhibidores y la homología de secuencia¹²; y a su vez cada familia posee entre 1 y 4 genes. Dentro de estas 11 familias, las fosfodiesterasas 4, 7 y 8 hidrolizan selectivamente el AMPc; 5, 6 y 9 son enzimas selectivas de GMPc y el resto (PDEs 1, 2, 3, 10 y 11) son duales, es decir, presentan afinidad por ambos nucleótidos¹³.

2.1. Estructura

Las PDEs de mamíferos comparten un gran número de características estructurales y funcionales. Todas ellas presentan un dominio catalítico relativamente conservado próximo al extremo C-terminal de la proteína, mientras que el dominio N-terminal presenta mayor diversidad estructural (**figura 2**). La combinación de las características del dominio catalítico y las propiedades del dominio regulador define cada familia de PDEs¹⁴.

El dominio catalítico es una región formada por alrededor de 270 aminoácidos plegados formando 16 α -hélices^{15,16}, considerando la hélice 3 como el comienzo del centro catalítico en todas las PDEs. La primera estructura cristalográfica disponible fue la de la isoforma PDE4B, publicada en el año 2000¹⁷. Cinco años más tarde, ya se disponía de 20 estructuras de diferentes isoformas de PDE1, PDE3, PDE4, PDE5 y PDE9, en las cuales había 11 residuos totalmente conservados, si bien hoy en día ya se sabe que, estrictamente hablando, solamente un residuo de glutamina (Gln369 en PDE4D2) es invariable¹⁸.

¹² Francis, S.H.; Turko, I.V.; Corbin, J.D. "Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function" *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2001**, 65, 1-52.

¹³ Conti, M.; Jin, S.L. "The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases" *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1999**, 63, 1-38.

¹⁴ Conti, M.; Richter, W. "Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in the CNS" en "Cyclic-nucleotide phosphodiesterases in the central nervous system", editado por Brandon, N.J. and West, A.R., Wiley, New Jersey (EE.UU.), **2014**, pp 1-45.

¹⁵ Manallack, D.T.; Hughes, R.A.; Thompson, P.E. "The next generation of phosphodiesterase inhibitors: structural clues to ligand and substrate selectivity of phosphodiesterases" *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3449-3462.

¹⁶ Ke, H.; Wang, H. "Crystal structures of phosphodiesterases and implications on substrate specificity and inhibitor selectivity" *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, 7, 391-403.

¹⁷ Xu, R.X.; Hassell, A.M.; Vanderwall, D.; Lambert, M.H.; Holmes, W.D.; Luther, M.A.; Rocque, W.J.; Milburn, M.V.; Zhao, Y.; Ke, H.; Nolte, R.T. "Atomic structure of PDE4: insights into phosphodiesterase mechanism and specificity" *Science* **2000**, 288, 1822-1825.

¹⁸ Ke, H.; Wang, H.; Ye, M.; Huang, Y. "Crystal structures of phosphodiesterases and implication on discovery of inhibitors" en "Cyclic-nucleotide phosphodiesterases in the central nervous system", editado por Brandon, N.J. and West, A.R., Wiley, New Jersey (EE.UU.) **2014**, pp 145-170.

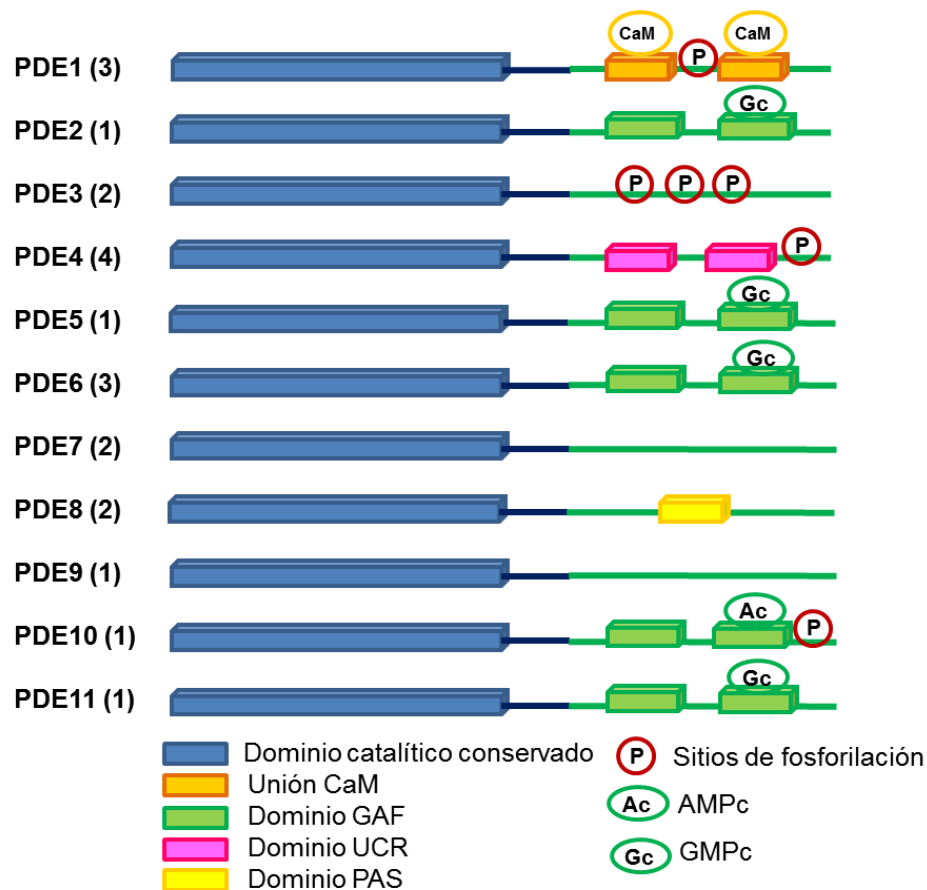


Figura 2. Estructura general de las fosfodiesterasas (el número de isoformas de cada PDE se indica entre paréntesis).

Numerosas investigaciones se han centrado en tratar de entender el mecanismo de reconocimiento del sustrato en cada una de las familias de PDEs. Se sabe que cada familia presenta diferente afinidad por los sustratos AMPc y GMPc, pero la razón por la que las distintas PDEs reconocen de manera selectiva uno u otro sustrato sigue siendo hoy desconocida. Basado en las estructuras cristalinas de los complejos de PDE4B y PDE4D, y de PDE5A con sus productos de hidrólisis AMP y GMP, respectivamente, así como en la estructura de PDE1B, capaz de hidrolizar ambos nucleótidos, Zhang propuso un mecanismo conocido como *glutamine switch*¹⁹ según el cual el grupo amido de la glutamina conservada puede rotar 180° según el nucleótido que se una, lo cual permitiría explicar dicha selectividad. Así, en PDE4 y PDE5 la libre rotación de la glutamina está impedida por la interacción con otros residuos de alrededor: en PDE4D, la Gln369 forma un enlace de hidrógeno con la Tyr329 a través del grupo carbonilo de la amida, por lo que

¹⁹ Zhang, K.Y.; Card, G.L.; Suzuki, Y.; Artis, D.R.; Fong, D.; Gillette, S.; Hsieh, D.; Neiman, J.; West, B.L.; Zhang, C.; Milburn, M.V.; Kim, S.H.; Schlessinger, J.; Bollag, G. "A glutamine switch mechanism for nucleotide selectivity by phosphodiesterases" *Mol. Cell.* **2004**, *15*, 279-286.

se une al nucleótido AMPc a través del nitrógeno, mientras que la Gln817 en PDE5A interacciona a través del nitrógeno de la amida con el carbonilo de la Gln775, uniéndose así el GMPc al oxígeno del grupo carbonilo. En PDE1B, que es dual, no existe ninguna restricción de este tipo que impida la libre rotación de la glutamina conservada (Gln421) para unir uno u otro nucleótido (**figura 3**).

Sin embargo, desde hace unos años, este mecanismo está siendo cuestionado²⁰⁻²² y parece ser que, aparte de la glutamina conservada, deben existir otros factores que influyen en el mecanismo de reconocimiento selectivo del sustrato en cada familia de PDEs.

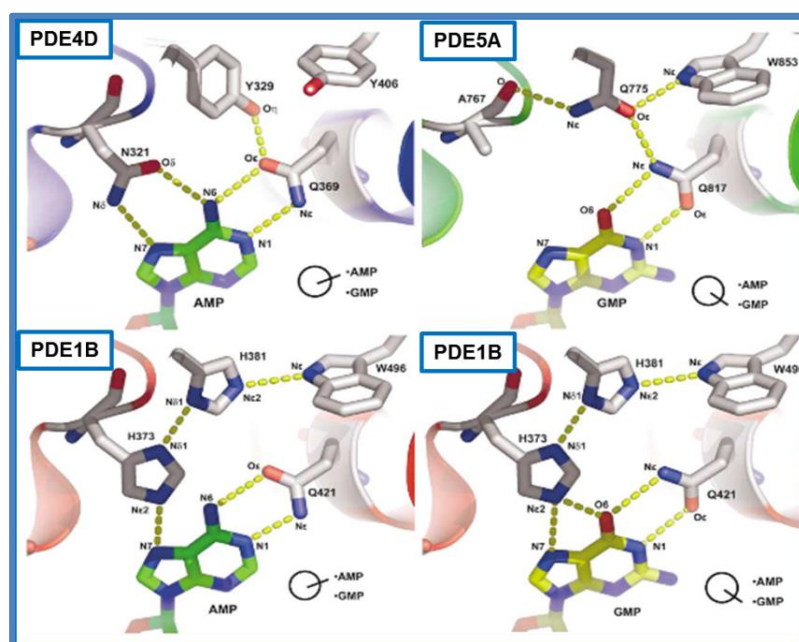


Figura 3. Mecanismo *glutamine switch* propuesto por Zhang y colaboradores¹⁹.

Dentro del dominio catalítico se localiza el centro activo de la enzima, que puede dividirse en dos subsitios principales: la zona de los metales y la zona de unión de sustratos/inhibidores.

La zona de los metales contiene dos cationes divalentes, Zn^{2+} y Mg^{2+} , los cuales presentan una coordinación octaédrica. El primero está coordinado con dos residuos de histidina, dos de aspártico y dos moléculas de agua, mientras el segundo presenta interacción con un residuo de aspártico y cinco moléculas de agua.

²⁰ Zoraghi, R.; Corbin, J.D.; Francis, S.H. "Phosphodiesterase-5 Gln⁸¹⁷ is critical for cGMP, Vardenafil, or Sildenafil affinity: its orientation impacts cGMP but not cAMP affinity" *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 5553-5558.

²¹ Wang, H.; Robinson, H.; Ke, H. "The molecular basis for different recognition of substrates by phosphodiesterase families 4 and 10" *J. Mol. Biol.* **2007**, 371, 302-307.

²² Wang, H.; Liu, Y.; Hou, J.; Zheng, M.; Robinson, H.; Ke, H. "Structural insight into substrate specificity of phosphodiesterase 10" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 5782-5787.

En la zona de unión de sustrato, es donde se localiza la glutamina conservada ya mencionada, además de otros aminoácidos, que varían ligeramente entre las distintas subfamilias. El modo de unión de cualquier ligando presenta, de manera general, dos características comunes: un enlace de hidrógeno con dicha glutamina, interacción que representa un factor determinante para la unión con los diferentes miembros de esta familia de enzimas, y una interacción aromática con una fenilalanina también muy conservada. Las interacciones con otros aminoácidos en función de las diferentes isoformas son las responsables del reconocimiento selectivo de diferentes inhibidores.

En cuanto a los dominios reguladores presentes en el extremo *N*-terminal, a pesar de la mayor divergencia, pueden identificarse unidades comunes tales como dominios de unión a calmodulina (CaM) en PDE1; dominios GAF (*cGMP-activated PDEs, adenylyl cyclase, and Fh1A*) en PDE2, PDE5, PDE6, PDE10 y PDE11; dominios UCR (*upstream conserved regions*) en PDE4; dominios REC (*receiver*) en PDE8; y dominios PAS (*period, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator and single minded*) en PDE8, así como sitios de fosforilación, que modulan la actividad de la enzima mediante modificaciones post-traslacionales y/o unión de ligandos (**figura 2**).

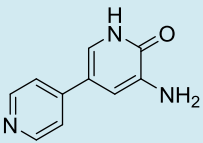
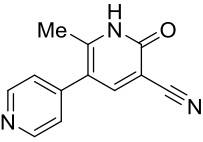
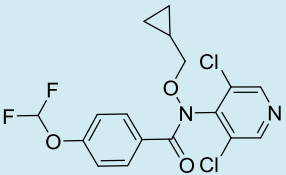
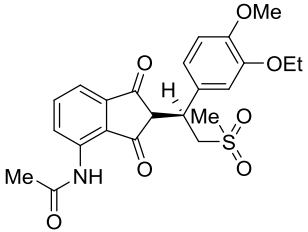
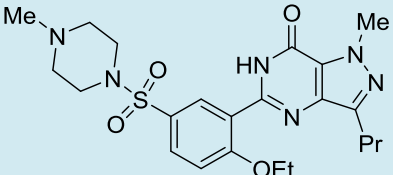
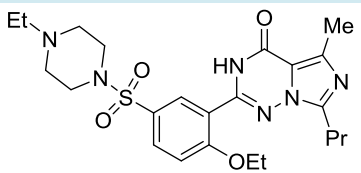
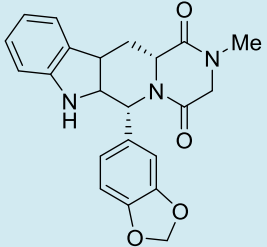
3. FOSFODIESTERASAS COMO DIANAS TERAPÉUTICAS

Las cascadas reguladas por PDEs son diversas e incluyen una gran cantidad de procesos, como proliferación y muerte celular, neuroplasticidad, activación de genes, locomoción, reacción a insulina, neurotransmisión, metabolismo, respuestas visuales, entre otras.

Los primeros estudios farmacológicos relacionados con las fosfodiesterasas se remontan a 1860, cuando Henry H. Salter escribió acerca de la cafeína y sus beneficios como remedio para el tratamiento del asma, en su libro titulado “*On asthma: Its pathology and treatment*”²³. La cafeína fue seguida de otras xantinas como el IBMX o la teofilina, todos ellos inhibidores no selectivos de las fosfodiesterasas, más conocidos en inglés como *pan-inhibitors*. Muchos años después, la importancia biológica de estas enzimas y su relevancia como dianas farmacológicas han logrado poner en el mercado algunos inhibidores para el tratamiento de diferentes enfermedades (**tabla 1**).

²³ Salter, H.H. “On asthma: Its pathology and treatment” **1860**, Chapter 1.

Tabla 1. Inhibidores de PDEs comercializados.

| Inhibidor | Fosfodiesterasa | Estructura |
|-------------|-----------------|--|
| Amrinona | PDE3 |  |
| Milrinona | PDE3 |  |
| Roflumilast | PDE4 |  |
| Apremilast | PDE4 |  |
| Sildenafil | PDE5 |  |
| Vardenafil | PDE5 |  |
| Tadalafil | PDE5 |  |

Los primeros fueron la Amrinona (1983) y la Milrinona (1989), inhibidores de PDE3, que están indicados como fármacos cardiotónicos, es decir, para el tratamiento de la insuficiencia cardiaca. Más tarde, en 1998, se aprobó el inhibidor selectivo de PDE5 Sildenafil, indicado para el tratamiento de la disfunción eréctil y comercializado bajo el

conocido nombre de Viagra®, seguido de otros análogos del mismo como Vardenafilo y Tadalafilo. La aprobación de Sildenafil, junto con todos los avances en modelización molecular, biología de proteínas, etc., desencadenó la aparición de numerosas patentes y publicaciones relacionadas con estas proteínas²⁴. Más recientemente han sido aprobados Roflumilast (2010) y Apremilast (2014), inhibidores de PDE4, empleados para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la artritis psoriática, respectivamente. Sin embargo, muchos otros inhibidores han fracasado ya en fases clínicas avanzadas debido, entre otras causas, a los efectos eméticos provocados por la inhibición de PDE4 y a los problemas cardíacos relacionados con los inhibidores de PDE3, lo cual refleja la dificultad del desarrollo clínico de inhibidores de estas enzimas.

3.1. Enfermedades neurodegenerativas y PDEs

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una muerte neuronal progresiva en un área determinada del cerebro. Dentro de éstas, las dos patologías con mayor incidencia entre la población son la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

En la enfermedad de Alzheimer, descrita por primera vez por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer en 1907²⁵, se produce la muerte de las neuronas colinérgicas en la corteza cerebral y el hipocampo, de manera que el cerebro se atrofia, conduciendo a una pérdida progresiva de las funciones cognitivas. La enfermedad de Parkinson, descrita por primera vez por el médico británico James Parkinson en 1817²⁶, se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en una zona del cerebro conocida como sustancia negra²⁷, y en este caso se produce mayoritariamente una alteración de las funciones motoras.

A pesar de la etiología desconocida que presentan estas patologías, se han identificado mecanismos comunes que podrían causar la muerte neuronal, tales como la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, o la acumulación de agregados proteicos, intracelulares o extracelulares, debido a un mal plegamiento de determinadas proteínas²⁸. Así, los cerebros de enfermos de Alzheimer presentan agregados del péptido β -amiloide (**figura 4A**), a nivel extracelular, en forma de placas neuríticas, y ovillos neurofibrilares en

²⁴ Maurice, D.H.; Ke, H.; Ahmad, F.; Wang, Y.; Chung, J.; Manganiello, V. "Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases" *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2014**, *13*, 290-314.

²⁵ Alzheimer, A. "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde" *Allg. Zeitschr Psychiatr. Psychiatr-Gerichtl. Med.* **1907**, *109*, 146-148.

²⁶ Parkinson, J. "An essay on the shaking palsy. 1817" *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, **2002**, *14*, 223-236.

²⁷ Rodríguez-Oroz, M.C.; Jahanshahi, M.; Krack, P.; Litvan, I.; Macias, R.; Bezard, E.; Obeso, J.A. "Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms" *Lancet Neurol.* **2009**, *8*, 1128-1139.

²⁸ Forman, M.S.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.-Y. "Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs" *Nat. Med.* **2004**, *10*, 1055-1063.

el interior de la célula debido a la hiperfosforilación de la proteína tau en estado patológico²⁹ (**figura 4B**). En la enfermedad de Parkinson, aparecen agregados citoplasmáticos y neuríticos de α -sinucleína conocidos como cuerpos de Lewy³⁰ (**figura 4C**).

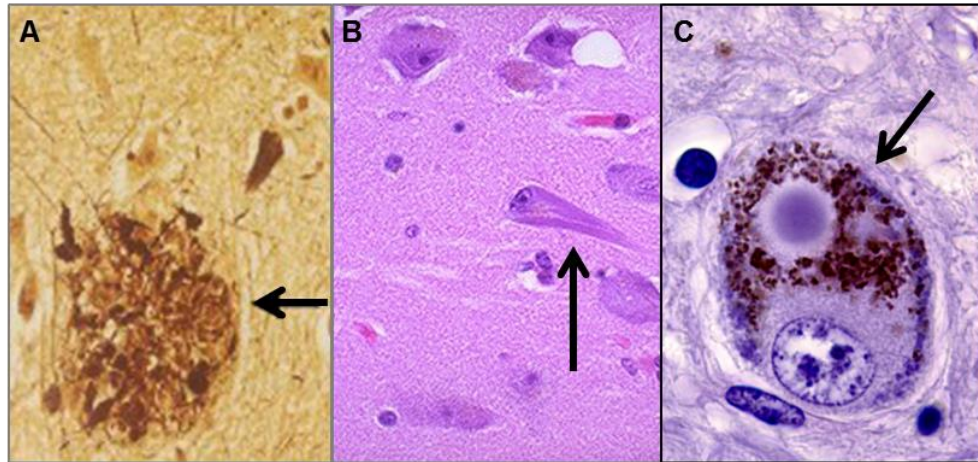


Figura 4. (A) Placas neuríticas y (B) ovillos neurofibrilares característicos de la enfermedad de Alzheimer. (C) Cuerpos de Lewy presentes en la enfermedad de Parkinson.

Otro de los mecanismos ampliamente estudiado en relación al proceso neurodegenerativo es la inflamación neuronal en determinadas áreas del cerebro³¹, en la que la activación de la microglía constituye un pilar muy importante³². De hecho, se han encontrado agrupaciones de microglía activada junto a las placas neuríticas que aparecen en la enfermedad de Alzheimer³³, y también junto a los cuerpos de Lewy en la enfermedad de Parkinson³⁴.

La microglía constituye el sistema inmunitario dentro del sistema nervioso central (SNC), encargándose de eliminar las sustancias de desecho y estructuras dañadas del mismo, y defendiéndolo de agentes externos, tales como virus o microorganismos³⁵. Cuando aparece un daño inflamatorio, se produce la activación de la microglía, de manera

²⁹ Ballard, C.; Gauthier, S.; Corbett, A.; Brayne, C.; Aarsland, D.; Jones, E. "Alzheimer's disease" *Lancet* **2011**, 377, 1019-1031.

³⁰ Schulz-Schaeffer, W.J. "The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia" *Acta Neuropathol.* **2010**, 120, 131-143.

³¹ Rogers, J. "The inflammatory response in Alzheimer's disease" *J. Periodontol.* **2008**, 79, 1535-1543.

³² Liu, B.; Hong, J.-S. "Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 304, 1-7.

³³ McGeer, P.L.; McGeer, E.G. "Inflammation and the degenerative diseases of aging" *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, 1035, 101-104.

³⁴ McGeer, P.L.; Itagaki, S.; Boyes, B.E.; McGeer, E.G. "Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains" *Neurology* **1988**, 38, 1285-1291.

³⁵ Ghosh, M.; Garcia-Castillo, D.; Aguirre, V.; Golshani, R.; Atkins, C.M.; Bramlett, H.M.; Dietrich, W.D.; Pearce, D.D. "Proinflammatory cytokine regulation of cyclic AMP-phosphodiesterase 4 signaling in microglia *in vitro* and following CNS injury" *Glia* **2012**, 60, 1839-1859.

que las células microgliales secretan una gran cantidad de factores, la mayoría de ellos con carácter proinflamatorio y neurotóxico, que incluyen especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS), glutamato, y citoquinas proinflamatorias tales como algunas interleuquinas (ILs) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Mediante este mecanismo, en un principio beneficioso, la microglía informa a las células inmunes para que acudan al área inflamada en cuestión. Sin embargo, cuando se produce una sobreactivación de la misma, tal y como ocurre en este tipo de enfermedades, aparece un círculo vicioso de inflamación y secreción de citoquinas, de manera que se rompe el equilibrio y el proceso inflamatorio prolifera, adquiriendo carácter crónico y potenciando así la neurodegeneración³⁶.

El AMPc juega un importante papel en este proceso. Así, un incremento en los niveles de este nucleótido ha demostrado ser capaz de retardar la activación de la microglía y la producción de citoquinas proinflamatorias, de tal manera que protege al organismo frente al daño inflamatorio³⁷. Por otro lado, el AMPc participa en la cascada de señalización celular del factor de transcripción CREB (*cAMP-responsive element binding*), gracias a su capacidad de unirse a la proteína kinasa A (PKA), la cual activa dicho factor mediante fosforilación³⁸. El importante papel de la vía AMPc/PKA/CREB en este tipo de patologías radica en que la activación de CREB está asociada a la regulación de neurotransmisores, factores de crecimiento y otras moléculas, todas ellas con importantes funciones en neuroplasticidad y supervivencia neuronal³⁹ (**figura 5**).

Existen dos vías para controlar los niveles de este nucleótido cíclico, bien mediante la activación de la actividad adenilato ciclasa, o bien, mediante la inhibición de la actividad fosfodiesterasa, siendo esta última la que tiene una mayor utilidad terapéutica⁴⁰.

³⁶ Pearse, D.D.; Pereira, F.C.; Stolyarova, A.; Barakat, D.J.; Bunge, M.B. "Inhibition of tumour necrosis factor- α by antisense targeting produces immunophenotypical and morphological changes in injury-activated microglia and macrophages" *Eur. J. Neurosci.* **2004**, 20, 3387-3396.

³⁷ Serezani, C.H.; Ballinger, M.N.; Aronoff, D.M.; Peters-Golden, M. "Cyclic AMP: Master regulator of innate immune cell function" *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2008**, 39, 127-132.

³⁸ Gonzalez, G.A.; Montminy, M.R. "Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133" *Cell* **1989**, 59, 675-680.

³⁹ Jancic, D.; Lopez de Armentia, M.; Valor, L.M.; Olivares, R.; Barco, A. "Inhibition of cAMP response element-binding protein caused by a complex frameshift mutation in the gene coding for reduces neuronal excitability and plasticity, and triggers neurodegeneration" *Cereb. Cortex* **2009**, 19, 2535-2547.

⁴⁰ Braun, C.M.; Huang, S.K.; Kagey-Sobotka, A.; Lichtenstein, L.M.; Essayan, D.M. "Co-regulation of antigen-specific T lymphocyte responses by type I and type II cyclic AMP-dependent protein kinases (cAK)" *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 56, 871-879.

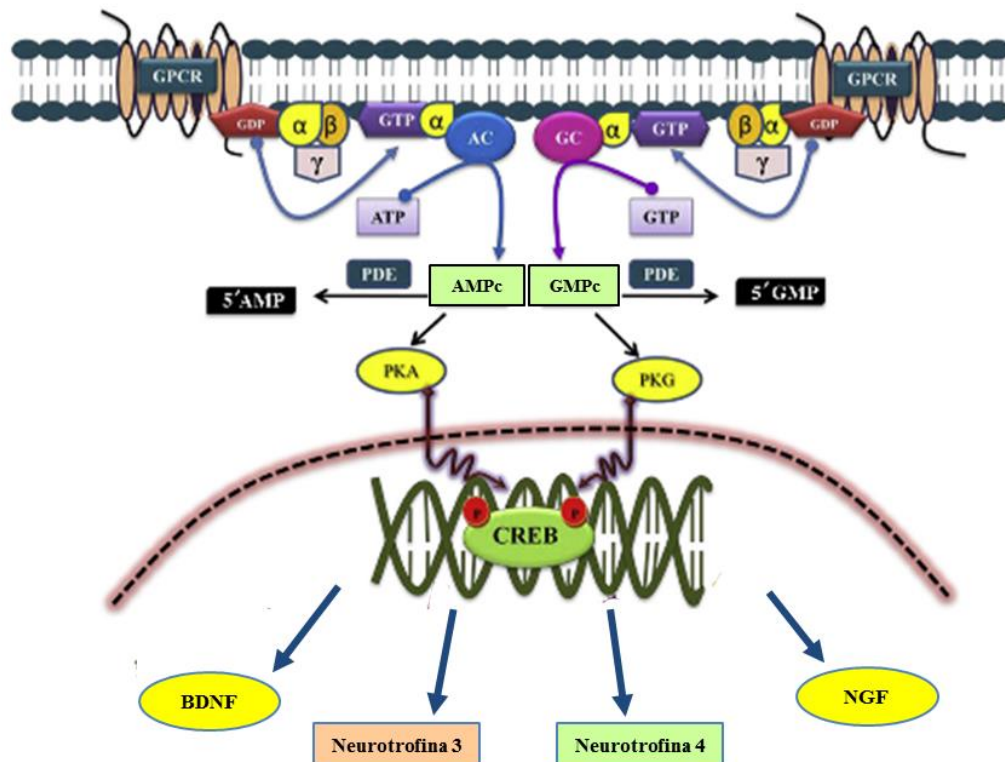


Figura 5. Cascada de señalización para la activación de CREB.

En la **figura 6** se muestra un gráfico en el que se compara la expresión de las diferentes PDEs en diferentes tejidos del organismo tales como corazón, páncreas, músculo, entre otros, y se observa que los mayores niveles de expresión están en una zona concreta del cerebro, el estriado, y son las isoformas PDE1B, PDE4D, PDE7B, PDE8B y PDE10A las más abundantes. Puesto que en las enfermedades neurodegenerativas son las neuronas las células dañadas, las fosfodiesterasas citadas arriba serían las más interesantes como dianas terapéuticas para un posible tratamiento. Debido a que las diferentes isoformas de PDE1 se expresan de manera muy ubicua en todo el organismo^{41,42}, y a que la inhibición de PDE4 lleva asociados efectos eméticos adversos^{43,44}, en el trabajo desarrollado en esta memoria se han seleccionado las fosfodiesterasas 7, 8 y 10 como dianas para el desarrollo de inhibidores que podrían permitir un tratamiento modificador del proceso neurodegenerativo.

⁴¹ Kakkar, R.; Raju, R.V.S.; Sharma, R.K. "Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1)" *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, 55, 1164-1186.

⁴² Menniti, F.S.; Faraci, W.S.; Schmidt, C.J. "Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development" *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 660-670.

⁴³ Mori, F.; Perez-Torres, S.; De Caro, R.; Porzionato, A.; Macchi, V.; Beleta, J.; Gavalda, A.; Palacios, J.M.; Mengod, G. "The human area postrema and other nuclei related to the emetic reflex express cAMP phosphodiesterases 4B and 4D" *J. Chem. Neuroanat.* **2010**, 40, 36-42.

⁴⁴ Hirose, R.; Manabe, H.; Nonaka, H.; Yanagawa, K.; Akuta, K.; Sato, S.; Ohshima, E.; Ichimura, M. "Correlation between emetic effect of phosphodiesterase 4 inhibitors and their occupation of the high-affinity rolipram binding site in *Suncus murinus* brain" *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, 573, 93-99.

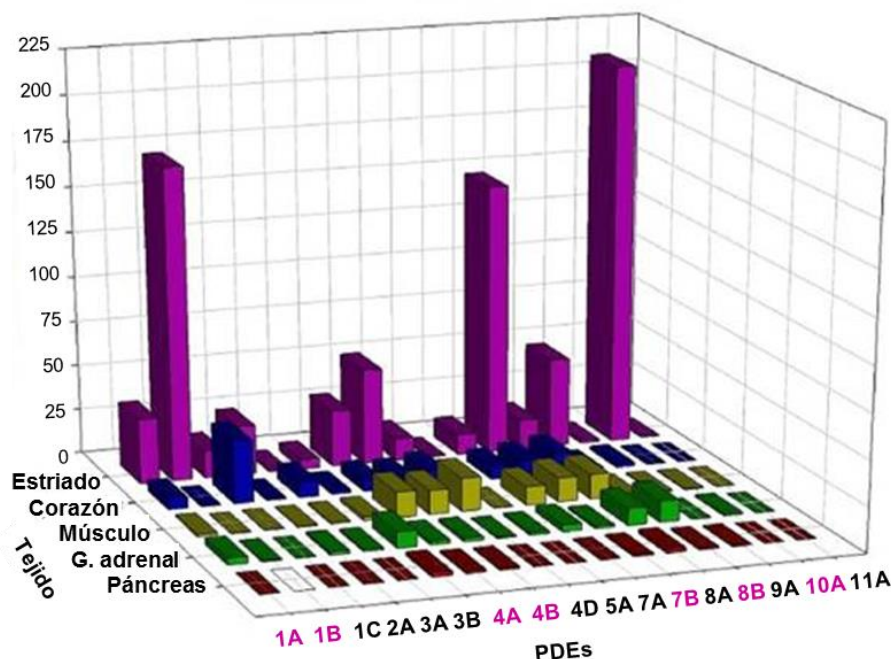


Figura 6. Distribución de las diferentes PDEs en los distintos tejidos del organismo.

3.1.1. Fosfodiesterasa 7

Esta enzima fue descubierta como una PDE específica de AMPc insensible al inhibidor de PDE4 Rolipram⁴⁵, y posteriormente identificada como PDE7 por Bloom y Beavo⁴⁶. Está codificada por dos genes, *PDE7A* y *PDE7B*, el primero está expresado mayoritariamente en el músculo esquelético, el sistema inmune y el cerebro, y el segundo se expresa fundamentalmente en cerebro, y de forma minoritaria en corazón, músculo esquelético o páncreas. Dentro del cerebro, PDE7A se encuentra en el bulbo olfativo, hipocampo y tronco cerebral; mientras que la expresión de PDE7B es más abundante en cerebelo, hipocampo y estriado. Estas isoenzimas presentan un porcentaje de homología del 70%, por lo que es muy difícil el diseño de inhibidores selectivos de una frente a otra⁴⁷.

El estudio de PDE7 como diana terapéutica surgió, en primera instancia, como una alternativa para evitar los efectos adversos que provoca la inhibición de PDE4, puesto que también es una PDE altamente expresada en cerebro y cuya inhibición incrementa los niveles de AMPc⁴⁸. La función de PDE7 no ha sido completamente elucidada, aunque sí se sabe que está involucrada en procesos inflamatorios y es necesaria para inducir la

⁴⁵ Ichimura, M.; Kase, H. "A new cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme expressed in the T-lymphocyte cell lines" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 193, 985-990.

⁴⁶ Bloom, T.J.; Beavo, J.A. "Identification and tissue-specific expression of PDE7 phosphodiesterase splice variants" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 14188-14192.

⁴⁷ Hetman, J.M.; Soderling, S.H.; Glavas, N.A.; Beavo, J.A. "Cloning and characterization of PDE7B, a cAMP-specific phosphodiesterase" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 472-476.

⁴⁸ Giembycz, M.A. "Life after PDE4: overcoming adverse events with dual-specificity phosphodiesterase inhibitors" *Curr. Opin. Pharmacol.* **2005**, 5, 238-244.

proliferación de las células T⁴⁹. El diseño de inhibidores selectivos de la misma está siendo de gran ayuda a la hora de tratar de conocer el papel fisiológico y patológico que esta enzima desempeña en el organismo así como proporcionar candidatos a fármaco.

3.1.1.1. Inhibidores de fosfodiesterasa 7

Los primeros inhibidores de PDE7, pertenecientes a la familia de las benzotiadiazinas (**1**) y benzotienotiadiazinas (**2**), fueron descritos por nuestro grupo de investigación⁵⁰. Unos años más tarde, fue descrito un inhibidor más potente y altamente selectivo, **BRL50481**⁵¹, perteneciente a la familia de las sulfonamidas desarrolladas por Celltech y SmithKline Beecham, que ha sido utilizado como herramienta farmacológica para el estudio de esta enzima. Aparte de estos inhibidores, otras familias estructuralmente diversas han sido desarrolladas (**figura 7**), muchas de las cuales se han reivindicado para el tratamiento de enfermedades relacionadas con los linfocitos T. Una de ellas engloba derivados de guanina, como el compuesto **3**, basados en el bioisosterismo de este heterociclo con la adenosina del AMPc, y presentan buena selectividad frente a PDE3 y PDE4⁵². En otra, la familia de los 1,3,4-tiadiazoles identificados por Warner-Lambert mediante técnicas de cribado de alto rendimiento, destaca el compuesto PF0332040, el cual ha mostrado excelente selectividad y propiedades antiinflamatorias *in vitro*^{53,54}. Las espiroquinazolininas, ejemplificadas en el derivado **4**, muestran excelente selectividad frente a PDE3A, PDE4D y PDE5, y han sido estudiadas para el tratamiento de enfermedades

⁴⁹ Nakata, A.; Ogawa, K.; Sasaki, T.; Koyama, N.; Wada, K.; Kotera, J.; Kikkawa, H.; Omori, K.; Kaminuma, O. "Potential role of phosphodiesterase 7 in human T cell function: comparative effects of two phosphodiesterase inhibitors" *Clin. Exp. Immunol.* **2002**, *128*, 460-466.

⁵⁰ Martínez, A.; Castro, A.; Gil, C.; Miralpeix, M.; Segarra, V.; Domenech, T.; Beleta, J.; Palacios, J. M.; Ryder, H.; Miro, X.; Bonet, C.; Casacuberta, J. M.; Azorin, F.; Piña, B.; Puigdomenech, P. "Benzyl derivatives of 2,1,3-benzo- and benzothieno[3,2-a]thiadiazine 2,2-dioxides: first phosphodiesterase 7 inhibitors" *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 683-689.

⁵¹ Smith, S.J.; Cieslinski, L.B.; Newton, R.; Donnelly, L.E.; Fenwick, P.S.; Nicholson, A.G.; Barnes, P.J.; Barnette, M.S.; Gienbycz, M.A. "Discovery of BRL50481 [3-(*N,N*-dimethylsulfonamido)-4-methyl-nitrobenzene], a selective inhibitor of phosphodiesterase 7: in vitro studies in human monocytes, lung macrophages, and CD8+ T-lymphocytes" *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 1679-1689.

⁵² Barnes, M.J.; Cooper, N.; Davenport, R.J.; Dyke, H.J.; Galleway, F.P.; Galvin, F.C.; Gowers, L.; Haughan, A.F.; Lowe, C.; Meissner, J.W.; Montana, J.G.; Morgan, T.; Picken, C.L.; Watson, R.J. "Synthesis and structure-activity relationships of guanine analogues as phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1081-1083.

⁵³ Vergne, F.; Bernardelli, P.; Lorthiois, E.; Pham, N.; Proust, E.; Oliveira, C.; Mafroud, A. K.; Royer, F.; Wrigglesworth, R.; Schellhaas, J.; Barvian, M.; Moreau, F.; Idrissi, M.; Tertre, A.; Bertin, B.; Coupe, M.; Berna, P.; Soulard, P. "Discovery of thiadiazoles as a novel structural class of potent and selective PDE7 inhibitors. Part 1: design, synthesis and structure-activity relationship studies" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4607-4613.

⁵⁴ Vergne, F.; Bernardelli, P.; Lorthiois, E.; Pham, N.; Proust, E.; Oliveira, C.; Mafroud, A. K.; Ducrot, P.; Wrigglesworth, R.; Berlioz-Seux, F.; Coleon, F.; Chevalier, E.; Moreau, F.; Idrissi, M.; Tertre, A.; Descours, A.; Berna, P.; Li, M. "Discovery of thiadiazoles as a novel structural class of potent and selective PDE7 inhibitors. Part 2: metabolism-directed optimization studies towards orally bioavailable derivatives" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4615-4621.

autoinmunes y del dolor neuropático⁵⁵. Otros inhibidores, cuya actividad se encuentra en el rango nanomolar, son los derivados de tieno[2,3-*c*]pirazoles, como **ASB16165**⁵⁶, el cual ha sido empleado para estudiar el papel de la enzima PDE7A en la activación de los linfocitos T. Por otro lado, una familia de pirimidinas (**5**) ha sido reivindicada como inhibidores de PDE7 para el tratamiento de enfermedades autoinmunes⁵⁷ puesto que ejercen un efecto positivo en la proliferación de las células T.

Adicionalmente y debido a la elevada expresión en cerebro de PDE7, se ha demostrado el papel que juegan sus inhibidores en las enfermedades del SNC⁵⁸. Así, por ejemplo, se identificó una familia de derivados de tioxoquinazolina mediante un cribado virtual por semejanza a partir de los derivados de benzotiadiazina previamente descritos⁵⁹, a la cual pertenece el candidato denominado **S14**, que actualmente se encuentra en desarrollo preclínico para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

En este ámbito, otra de las enfermedades en la que los inhibidores de PDE7 han mostrado un alto potencial es la esclerosis múltiple. Esta patología se caracteriza por una desmielinización de las neuronas, y aunque es considerada actualmente una enfermedad autoinmune, podría clasificarse a su vez como neurodegenerativa puesto que comparte diversas características con este tipo de patologías tales como una etiología desconocida y la aparición de un proceso inflamatorio subyacente, desembocando finalmente en una pérdida de funciones motoras y de las funciones cognitivas, entre otros síntomas^{60,61}. Uno de los modelos animales empleados para el estudio de esta patología es el modelo de encefalomiелitis alérgica experimental (EAE)⁶², en el que inhibidores de PDE7, pertenecientes a familias químicamente diversas desarrolladas en nuestro grupo de investigación, han sido evaluados con éxito: el compuesto **VP3.15** perteneciente a una

⁵⁵ Bernardelli, P.; Vergne, F.; Mendes, C.; Ducrot, P. "New Spirocondensed quinazolinones and their use as phosphodiesterase inhibitors" **2004**, WO2004/026818.

⁵⁶ Kadoshima-Yamaoka, K.; Murakawa, M.; Goto, M.; Tanaka, Y.; Inoue, H.; Murafuji, H.; Nagahira, A.; Hayashi, Y.; Nagahira, K.; Miura, K.; Nakatsuka, T.; Chamoto, K.; Fukuda, Y.; Nishimura, T. "ASB16165, a novel inhibitor of phosphodiesterase 7A (PDE7A) suppresses IL-12-induced IFN-gamma production by mouse activated T lymphocytes" *Immunol. Lett.* **2009**, *22*, 193-197.

⁵⁷ Guo, J.; Watson, A.; Kempson, J.; Carlsen, M.; Barbosa, J.; Stebbins, K.; Lee, D.; Dood, J.; Nadler, S.; McKinnon, M.; Barrish, J.; Pitts, W. "Identification of potent pyrimidine inhibitors of phosphodiesterase 7 (PDE7) and their ability to inhibit T cell proliferation" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1935-1938.

⁵⁸ Gil, C.; Campillo, N.E.; Perez, D.I.; Martinez, A. "Phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors as new drugs for neurological and inflammatory disorders" *Expert. Opin. Ther. Pat.* **2008**, *18*, 1127-1139.

⁵⁹ Castro, A.; Jerez, M. J.; Gil, C.; Calderon, F.; Domenech, T.; Nueda, A.; Martinez, A. "CODES, a novel procedure for ligand-based virtual screening: PDE7 inhibitors as an application example" *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1349-1359.

⁶⁰ Hauser, S.L.; Oksenberg, J.R. "The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration" *Neuron* **2006**, *52*, 61-76.

⁶¹ Martínez-Lapiscina, E.H.; Fraga-Pumar, E.; Gabilondo, I.; Martínez-Heras, E.; Torres-Torres, R.; Ortiz-Pérez, S.; Llufríu, S.; Tercero, A.; Andorra, M.; Figueras Roca, M.; Lampert, E.; Zubizarreta, I.; Saiz, A.; Sanchez-Dalmau, B.; Villoslada, P. "The multiple sclerosis visual pathway cohort: understanding neurodegeneration in MS" *BMC Research Notes* **2014**, *7*, 910-922.

⁶² Constantinescu, C.S.; Farooqi, N.; O'Brien, K.; Gran, B. "Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)" *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *164*, 1079-1106.

familia de iminotiadiazoles identificada mediante cribado virtual⁶³; el derivado de furano **MR1.51** desarrollado a partir de un modelo de farmacóforo⁶⁴; o la tioxoquinazolina **TC3.6**, perteneciente a la misma familia química que **S14**⁶⁵.

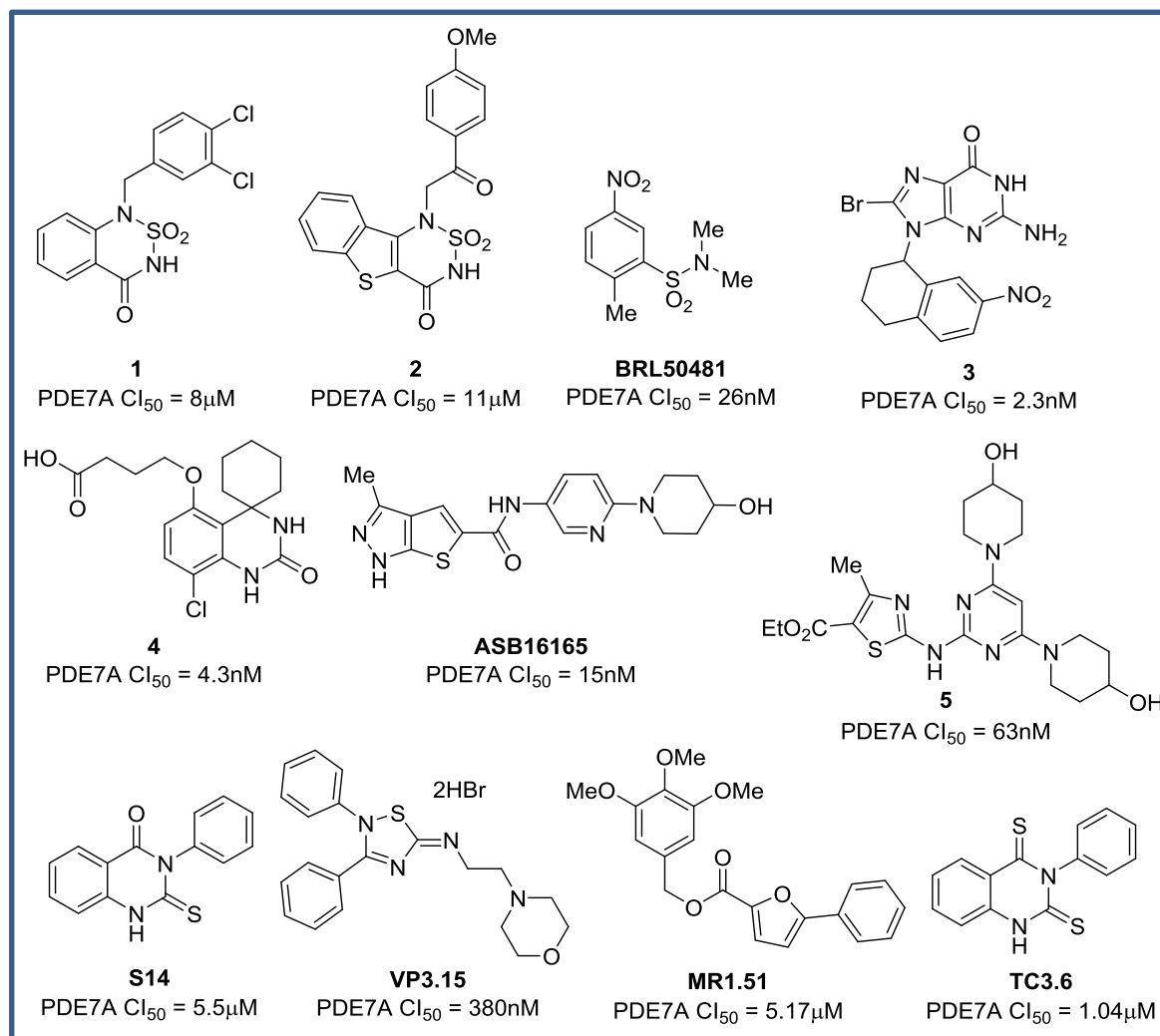


Figura 7. Inhibidores de PDE7.

⁶³ Redondo, M.; Palomo, V.; Brea, J.; Perez, D.I.; Martín-Álvarez, R.; Perez, C.; Paul-Fernandez, N.; Cadavid, M.I.; Loza, M.I.; Mengod, G.; Martinez, A.; Gil, C.; Campillo, N.E. "Identification in silico and experimental validation of novel phosphodiesterase 7 inhibitors with efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis mice" *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, 3, 793-803.

⁶⁴ Redondo, M.; Brea, J.; Perez, D.I.; Soteras, I.; Val, C.; Perez, C.; Morales-García, J.A.; Alonso-Gil, S.; Paul-Fernandez, N.; Martín-Alvarez, R.; Cadavid, M.I.; Loza, M.I.; Perez-Castillo, A.; Mengod, G.; Campillo, N.E.; Martinez, A.; Gil, C. "Effect of phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors in experimental autoimmune encephalomyelitis mice: Discovery of a new chemically diverse family of compounds" *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 3274-3284.

⁶⁵ Gonzalez-Garcia, C.; Bravo, B.; Ballester, A.; Gomez-Perez, R.; Eguluz, C.; Redondo, M.; Martinez, A.; Gil, C.; Ballester, S. "Comparative assessment of PDE4 and 7 inhibitors as therapeutic agents in experimental autoimmune encephalomyelitis" *Br. J. Pharmacol.* **2013**, 170, 602-613.

3.1.2. Fosfodiesterasa 8

Esta enzima no fue caracterizada y aislada hasta 1998, debido a la insensibilidad que presenta hacia el inhibidor no selectivo de PDEs IBMX⁶⁶. Está formada por dos genes, *PDE8A* y *PDE8B*, los cuales presentan diferente patrón de distribución en el organismo: mientras que *PDE8A* se expresa en células de Leydig en los testículos⁶⁷ y en cardiomiocitos⁶⁸, *PDE8B* se encuentra en las glándulas tiroidea⁶⁹ y adrenal⁷⁰, y en cerebro⁷¹. En cuanto a la estructura, esta enzima posee dos dominios en la zona del extremo *N*-terminal, dominios *REC* y *PAS* (**figura 2**), que son únicos en esta familia de PDEs y tienen un alto porcentaje de homología con otros encontrados en bacterias y otras proteínas humanas⁷².

La función de esta enzima no está clara, lo que puede ser debido en gran parte a la falta de inhibidores potentes y selectivos de la misma hasta hace unos años. No obstante, asociándola con los tejidos donde se expresa, puede relacionarse con la producción de testosterona, función tiroidea y desórdenes cognitivos⁷³. En relación a éstos últimos, se sabe que existe una sobreexpresión de *PDE8B* en cerebros de pacientes con Alzheimer avanzado⁷⁴, por lo que la inhibición de esta enzima podría ser un tratamiento eficaz para dicha patología. Además, también se ha publicado que la inhibición de la misma protege frente a deficiencias motoras, como las presentes en la enfermedad de Parkinson⁷⁵.

⁶⁶ Fisher, D.A.; Smith, J.H.F.; Pillar, J.S.; St Denis, S.H.; Cheng, J.B. "Isolation and characterization of *PDE8A*, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *246*, 570-577.

⁶⁷ Vasta, V.; Shimizu-Albergine, M.; Beavo, J.A. "Modulation of Leydig cell function by cyclic nucleotide phosphodiesterase 8A" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 19925-19930.

⁶⁸ Patrucco, E.; Albergine, M.S.; Santana, L.F.; Beavo, J.A. "Phosphodiesterase 8A (*PDE8A*) regulates excitation-contraction coupling in ventricular myocytes" *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2010**, *49*, 330-333.

⁶⁹ Hayashi, M.; Shimada, Y.; Nishimura, Y.; Hama, T.; Tanaka, T. "Genomic organization, chromosomal localization, and alternative splicing of the human phosphodiesterase 8B gene" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *297*, 1253-1258.

⁷⁰ Horvath, A.; Giatzakis, C.; Tsang, K.; Greene, E.; Osorio, P.; Boikos, S.; Libè, R.; Patronas, Y.; Robinson-White, A.; Remmers, E.; Bertherat, J.; Nesterova, M.; Stratakis, C.A. "A cAMP-specific phosphodiesterase (*PDE8B*) that is mutated in adrenal hyperplasia is expressed widely in human and mouse tissues: a novel *PDE8B* isoform in human adrenal cortex" *Eur. J. Hum. Genet.* **2008**, *16*, 1245-1253.

⁷¹ Appenzeller, S.; Schirmacher, A.; Halfter, H.; Bäumer, S.; Pendziwiat, M.; Timmerman, V.; De Jonghe, P.; Fekete, K.; Stögbauer, F.; Lüdemann, P.; Hund, M.; Quabius, E.S.; Ringelstein, E.B.; Kühlenbäumer, G. "Autosomal-dominant striatal degeneration is caused by a mutation in the phosphodiesterase 8B gene", *Am. J. Hum. Genet.*, **2010**, *86*, 83-87.

⁷² Menniti, F.S.; Plath, N.; Svenstrup, N.; Schmidt, C.J. "Pharmacological manipulation of cyclic nucleotide phosphodiesterases signaling for the treatment of neurological and psychiatric disorders in the brain" en "Cyclic-nucleotide phosphodiesterases in the central nervous system", editado por Brandon, N.J. and West, A.R., Wiley, New Jersey (EE.UU.), **2014**, pp 77-113.

⁷³ Gamanuma, M.; Yuasa, K.; Sasaki, T.; Sakurai, N.; Kotera, J.; Omori, K. "Comparison of enzymatic characterization and gene organization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 8 family in humans" *Cell Signal.* **2003**, *15*, 565-574.

⁷⁴ Perez-Torres, S.; Cortes, R.; Tolnay, M.; Probst, A.; Palacios, J.M.; Mengod, G. "Alterations on phosphodiesterase type 7 and 8 isozyme mRNA expression in Alzheimer's disease brains examined by in situ hybridization" *Exp. Neurol.* **2003**, *182*, 322-334.

⁷⁵ Tsai, L.C.; Chan, G.C.; Nangle, S.N.; Shimizu-Albergine, M.; Jones, G.L.; Storm, D.R.; Beavo, J.A.; Zweifel, L.S. "Inactivation of *Pde8b* enhances memory, motor performance, and protects against age-induced motor coordination decay" *Genes Brain Behav.* **2012**, *11*, 837-847.

3.1.2.1. Inhibidores de fosfodiesterasa 8

Los primeros inhibidores descritos fueron el **Dipiridamol**⁷⁶ (**figura 8**) y posteriormente algunos compuestos pertenecientes a una familia de quinazolinodionas descritos inicialmente como inhibidores de PDE7 (**6**)⁷⁷, si bien ninguno de los anteriores eran inhibidores selectivos de la enzima PDE8.

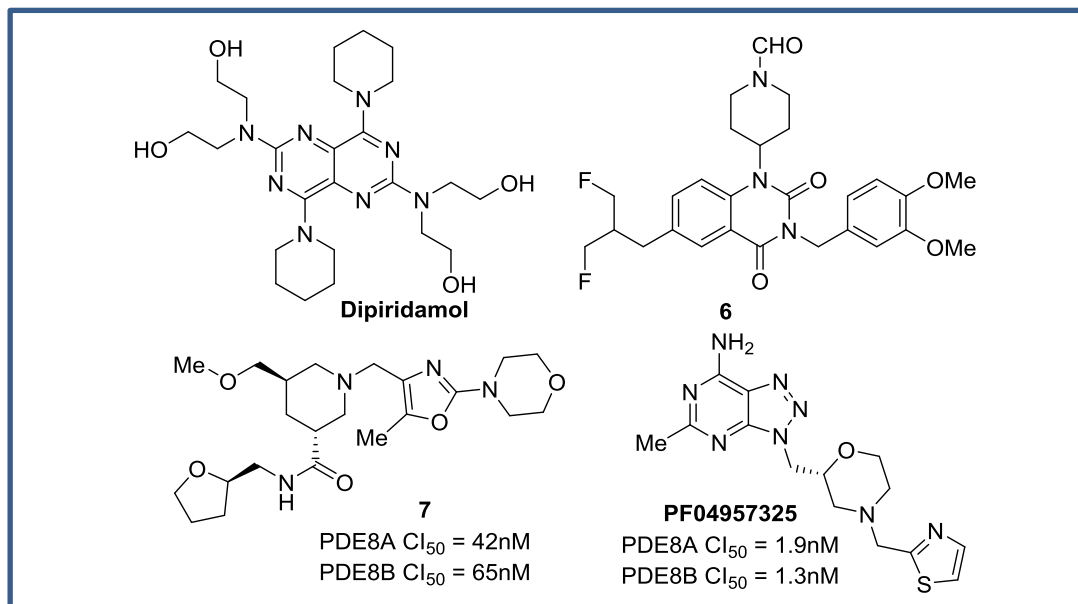


Figura 8. Inhibidores de PDE8.

No fue hasta 2011 cuando Pfizer, después de varias campañas de cribado de alto rendimiento, describió los primeros inhibidores selectivos de PDE8 como potenciales agentes antidiabéticos (**7**)⁷⁸, basados en la estructura de una tetrahydroisoquinolina identificada como cabeza de serie. La misma compañía ha desarrollado una familia de triazolopirimidinas, a la que pertenece el compuesto **PF04957325**, que se eligió para continuar su desarrollo preclínico, aunque finalmente fue paralizado porque provocaba problemas cardíacos en un modelo animal utilizado para evaluar la seguridad cardiovascular⁷⁹ (**figura 8**).

⁷⁶ Dong, H.; Osmanova, V.; Epstein, P.M.; Brocke, S. "Phosphodiesterase 8 (PDE8) regulates chemotaxis of activated lymphocytes" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 345, 713-719.

⁷⁷ Clauss, A.; Glaess, C.; Marciniak, G.; Muzet, N.; Nave, J.F.; Seyer, A.; Vivet, B. "Quinazolinodione derivatives, their preparation and their therapeutic applications as PDE7 inhibitors and in select cases as PDE8 inhibitors" **2009**, WO2009/077680A1.

⁷⁸ DeNinno, M.P.; Wright, S.W.; Visser, M.S.; Etienne, J.B.; Moore, D.E.; Olson, T.V.; Rocke, B.N.; Andrews, M.P.; Zarbo, C.; Millham, M.L.; Boscoe, B.P.; Boyer, D.D.; Doran, S.D.; Houseknecht, K.L. "1,5-Substituted nipecotic amides: selective PDE8 inhibitors displaying diastereomer-dependent microsomal stability" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 3095-3098.

⁷⁹ DeNinno, M.P.; Wright, S.W.; Etienne, J.B.; Olson, T.V.; Rocke, B.N.; Corbett, J.W.; Kung, D.W.; DiRico, K.J.; Andrews, K.M.; Millham, M.L.; Parker, J.C.; Esler, W.; Van Volkenburg, M.; Boyer, D.D.; Houseknecht, K.L.; Doran, S.D. "Discovery of triazolopyrimidine-based PDE8B inhibitors: exceptionally ligand-efficient and

3.1.3. Fosfodiesterasa 10

PDE10 fue descrita por primera vez en 1999⁸⁰, siendo la única PDE que poseía una sola isoenzima, PDE10A, si bien dentro de esta existen al menos 11 isoformas, de las cuales PDE10A1 y PDE10A2 son sin duda las más abundantes en humanos⁸¹. Su estructura completa contiene 779 aminoácidos, en los cuales se engloba tanto el dominio catalítico como los dominios reguladores GAF A y GAF B, próximos al extremo *N*-terminal (figura 9).

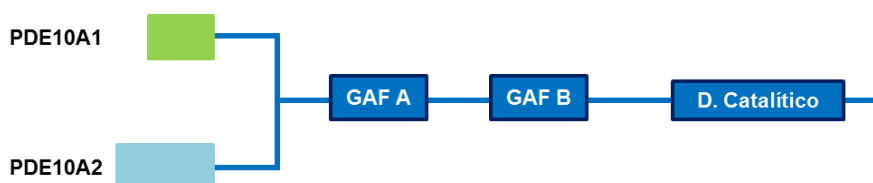


Figura 9. Esquema de la estructura de PDE10.

Existen depositadas en el PDB 16 estructuras de PDE10A humanas, de las cuales 15 corresponden al dominio catalítico, formado por 15 α -hélices que engloban el centro activo, y la última de ellas corresponde a los dominios GAF, los cuales también están presentes en otras fosfodiesterasas humanas tales como PDE2, PDE5, PDE6 y PDE11⁸². La estructura de los dominios GAF de PDE10A está cristalizada como dímero (PDB: 2ZMF), y su monómero comprende 189 aminoácidos estructurados en 6 láminas β -antiparalelas y 3 α -hélices⁸³ (figura 10).

lipophilic ligand-efficient compounds for the treatment of diabetes" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 5721-5726.

⁸⁰ Fujishige, K.; Kotera, J.; Michibata, H.; Yuasa, K.; Takebayashi, S.; Okumura, K.; Omori, K. "Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A)" *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 18438-18445.

⁸¹ Loughney, K.; Snyder, P.B.; Uher, L.; Rosman, G.J.; Ferguson, K.; Florio, V.A. "Isolation and characterization of PDE10A, a novel human 3', 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase" *Gene* **1999**, 234, 109-117.

⁸² Heikaus, C.C.; Pandit, J.; Klevit, R.E. "Cyclic nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases: structural and mechanistic insights" *Structure* **2009**, 17, 1551-1557.

⁸³ Handa, N.; Mizohata, E.; Kishishita, S.; Toyama, M.; Morita, S.; Uchikubo-Kamo, T.; Akasaka, R.; Omori, K.; Kotera, J.; Terada, T.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S. "Crystal structure of the GAF-B domain from human phosphodiesterase 10A complexed with its ligand, cAMP" *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 19657-19664.

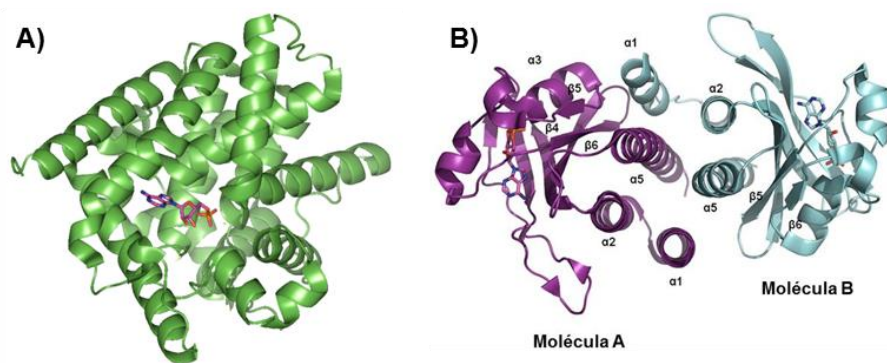


Figura 10. Estructura cristalográfica del dominio catalítico (PDB: 2OUN) **(A)** y del dominio GAF (PDB: 2ZMF) **(B)** de PDE10A, cristalizados ambos con AMPc.

La existencia de este último dominio pone de manifiesto la posibilidad de regular la actividad de esta enzima de un modo alostérico, estrategia muy interesante a la hora de conseguir selectividad frente a otras PDEs. No obstante, exceptuando el AMPc, no se ha publicado hasta la fecha ninguna molécula capaz de interaccionar con este dominio⁸⁴.

PDE10A se expresa fundamentalmente en el estriado⁸⁰, y es su alto nivel de expresión en las neuronas de esta parte del cerebro lo que pone de manifiesto el importante papel que podría jugar en todas las cascadas de señalización donde los ganglios basales están implicados. Estas incluyen, por ejemplo, enfermedades neuropsiquiátricas como la esquizofrenia, donde inhibidores de esta enzima han llegado a fases clínicas^{85,86}. Por otro lado, puesto que los ganglios basales se asocian también con el control de las funciones motoras, los inhibidores de PDE10 pueden también tener un importante papel en otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington⁸⁷ y la enfermedad de Parkinson. Respecto a esta última, no se ha demostrado, hasta el momento, la eficacia de los inhibidores de PDE10A en ningún modelo animal de la enfermedad, si bien hay datos suficientes que avalan a PDE10A como diana prometedora en el tratamiento de la misma⁸⁸, ya que las manifestaciones clínicas que la

⁸⁴ Chappie, T.A.; Verhoest, P. "The function, enzyme kinetics, structural biology and medicinal chemistry of PDE10A" en "Phosphodiesterases and their inhibitors" editado por Liros, S. and Bell, A.S., Wiley-VCH, Weinheim (Germany), **2014**, pp 65-81.

⁸⁵ Schmidt, C.J.; Chapin, D.S.; Cianfrogna, J.; Corman, M.L.; Hajos, M.; Harms, J.F.; Hoffman, W.E.; Lebel, L.A.; McCarthy, S.A.; Nelson, F.R.; Proulx-LaFrance, C.; Majchrzak, M.J.; Ramirez, A.D.; Schmidt, K.; Seymour, P.A.; Siuciak, J.A.; Tingley, F.D., 3rd; Williams, R.D.; Verhoest, P.R.; Menniti, F.S. "Preclinical characterization of selective phosphodiesterase 10A inhibitors: a new therapeutic approach to the treatment of schizophrenia" *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, 325, 681-690.

⁸⁶ Kehler, J.; Nielsen, J. "PDE10A inhibitors: novel therapeutic drugs for schizophrenia" *Curr. Pharm. Des.* **2011**, 17, 137-150.

⁸⁷ Giampa, C.; Patassini, S.; Borreca, A.; Laurenti, D.; Marullo, F.; Bernardi, G.; Menniti, F.S.; Fusco, F.R. "Phosphodiesterase 10 inhibition reduces striatal excitotoxicity in the quinolinic acid model of Huntington's disease" *Neurobiol. Dis.* **2009**, 34, 450-456.

⁸⁸ García, A.M.; Redondo, M.; Martínez, A.; Gil, C. "Phosphodiesterase 10 inhibitors: new disease modifying drugs for Parkinson's disease?" *Curr. Med. Chem.* **2014**, 21, 1171-1187.

caracterizan están causadas por la degeneración en la entrada de dopamina hacia las neuronas del estriado, donde la concentración de esta enzima es abundante.

3.1.3.1. Inhibidores de fosfodiesterasa 10

El primer inhibidor de PDE10A descrito en la literatura fue el producto natural **Papaverina (figura 11)**⁸⁹, cuya potencia de inhibición es del orden nanomolar, y aunque presenta ciertas limitaciones en cuanto a selectividad así como en su empleo *in vivo*⁸⁴, ha representado una herramienta farmacológica de gran utilidad para entender el papel de esta enzima en la regulación de la señalización relacionada con los ganglios basales. Por ejemplo, ha demostrado ser eficaz en modelos de comportamiento antipsicótico⁹⁰, de ahí el papel de PDE10 en el tratamiento de enfermedades de este tipo. Seguidamente, Pfizer publicó la estructura de rayos X de la enzima con el inhibidor **8 (figura 11)**, estructuralmente semejante a la papaverina⁹¹, que sirvió como base para el posterior desarrollo de nuevos inhibidores. Aunque en los inhibidores así desarrollados la selectividad frente a PDE3 se vio comprometida inicialmente, estudios posteriores de modelización y difracción de rayos X permitieron identificar las diferencias en el sitio catalítico de estas dos PDEs, lo que les condujo a la identificación del inhibidor **PQ10 (figura 11)**^{92,93}, altamente potente, muy selectivo hacia otras dianas del SNC y con un buen perfil de actividad *in vivo*. Otros grupos también han trabajado en el diseño de inhibidores basados en este producto natural^{94,95}.

Diferentes campañas de cribado de alto rendimiento, seguidas de programas de química médica, llevadas a cabo por varios grupos de investigación han proporcionado inhibidores potentes, selectivos y en algunos casos con un buen perfil de actividad *in vivo* (**figura 11**).

⁸⁹ Lebel, L.A.; Menniti, F.S.; Schmidt, C.J. "Therapeutic use of selective PDE10A inhibitors" **2006**, US20030032579A1.

⁹⁰ Siuciak, J.A.; Chapin, D.S.; Harms, J.F.; Lebel, L.A.; McCarthy, S.A.; Chambers, L.; Shrikhande, A.; Wong, S.; Menniti, F.S.; Schmidt, C.J. "Inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: a novel approach to the treatment of psychosis" *Neuropharmacol.* **2006**, *51*, 386-396.

⁹¹ Pandit, J. "Crystal structure of catalytic domain of rat 3',5'- cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE10) inhibitor complex and uses in the discovery of psychotherapeutic drugs" **2005**, US20050202550.

⁹² Chappie, T.A.; Humphrey, J.M.; Allen, M.P.; Estep, K.G.; Fox, C.B.; Lebel, L.A.; Liras, S.; Marr, E.S.; Menniti, F.S.; Pandit, J.; Schmidt, C.J.; Tu, M.; Williams, R.D.; Yang, F.V. "Discovery of a series of 6,7-dimethoxy- 4-pyrrolidylquinazoline PDE10A inhibitors" *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 182- 185.

⁹³ Helal, C.J.; Kang, Z.; Hou, X.; Pandit, J.; Chappie, T.A.; Humphrey, J.M.; Marr, E.S.; Fennell, K.F.; Chenard, L.K.; Fox, C.; Lebel, L.; Menniti, F.; Cianfrogna, J.; Fonseca, K.R.; Nelson, F.R.; O'Connor, R.; MacDougall, M.; McDowell, L.; Liras, S. "Use of structure-based design to discover a potent, selective, in vivo active phosphodiesterase 10A inhibitor lead series for the treatment of schizophrenia" *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4536-4547.

⁹⁴ Zhang, Z.; Lu, X.; Xu, J.; Rothfuss, J.; Mach, R.H.; Tu, Z. "Synthesis and in vitro evaluation of new analogues as inhibitors for phosphodiesterase 10A" *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3986- 3995.

⁹⁵ Ho, G.D.; Michael Segarish, W.; Bercovici, A.; Tulshian, D.; Greenlee, W.J.; Van Rijn, R.; Hruza, A.; Xiao, L.; Rindgen, D.; Mullins, D.; Guzzi, M.; Zhang, X.; Bleickardt, C.; Hodgson, R. "The SAR development of dihydroimidazoisoquinoline derivatives as phosphodiesterase 10A inhibitors for the treatment of schizophrenia" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2585-2589.

En el caso de Pfizer, una de estas campañas les permitió la identificación de un compuesto, que tras posterior optimización tanto de la potencia y la selectividad como de las propiedades ADME, dio lugar al inhibidor **MP10/PF2545920**⁹⁶, el cual ha llegado hasta fase clínica II para el tratamiento de la esquizofrenia. Estudios acerca del modo de unión muestran, aparte de las interacciones con las fenilalaninas conservadas en el centro activo de las PDEs (Phe729 y Phe696 en PDE10A), la disposición del anillo de quinolina en un bolsillo lipófilo que es único en esta PDE, lo que podría explicar su alto grado de selectividad⁹⁷. Si bien este inhibidor no superó la fase II por falta de eficacia frente al placebo⁹⁸, ha permitido conocer características estructurales de la enzima muy importantes para su inhibición selectiva, y a partir de él se han desarrollado más familias basadas en la interacción en ese bolsillo selectivo^{99,100}.

Por otro lado, Pfizer también identificó como cabeza de serie el derivado tricíclico **9** que presentaba una estructura totalmente novedosa respecto a los inhibidores de PDE10 descritos hasta la fecha¹⁰¹, y a partir del cual se llegó al compuesto **10**, que ha mostrado eficacia en un modelo animal de psicosis¹⁰². Otros heterociclos tricíclicos fusionados, como el derivado de triazoloquinazolina **11**¹⁰³ y el derivado de pirazoloquinolina **12**¹⁰⁴, fueron identificados por Lundbeck y Merck, respectivamente.

⁹⁶ Giampà, C.; Laurenti, D.; Anzilotti, S.; Bernardi, G.; Menniti, F.S.; Fusco, F.R. "Inhibition of the striatal specific phosphodiesterase PDE10A ameliorates striatal and cortical pathology in R6/2 mouse model of Huntington's disease" *PLoS One* **2010**, *5*, e13417.

⁹⁷ Verhoest, P.R.; Chapin, D.S.; Corman, M.; Fonseca, K.; Harms, J.F.; Hou, X.; Marr, E.S.; Menniti, F.S.; Nelson, F.; O'Connor, R.; Pandit, J.; Proulx-Lafrance, C.; Schmidt, A.W.; Schmidt, C.J.; Suiciak, J.A.; Liras, S. "Discovery of a novel class of phosphodiesterase 10A inhibitors and identification of clinical candidate 2-[4-(1-methyl-4-pyridin-4-yl-1H-pyrazol-3-yl)-phenoxy]methyl-quinoline (PF-2545920) for the treatment of schizophrenia" *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5188-5196.

⁹⁸ De Martinis, N.; Banerjee, A.; Kumar, V.; Boyer, S.; Schmidt, C.; Arroyo, S. "Results of a phase 2A proof-of-concept trial with a PDE10A inhibitor in the treatment of acute exacerbation of schizophrenia" *Schizophr. Res.* **2012**, *136*, S262.

⁹⁹ Verhoest, P.R.; Helal, C.J. "Bicyclic heteroaryl compounds as PDE10A inhibitors" **2007**, US20070155779.

¹⁰⁰ Verhoest, P.R. "Tricyclic heteroaryl compounds as PDE10A inhibitors" **2008**, WO2008001182.

¹⁰¹ Höfgen, N.; Stange, H.; Schindler, R.; Lankau, H.J.; Grunwald, C.; Langen, B.; Egerland, U.; Tremmel, P.; Pangalos, M.N.; Marquis, K.L.; Hage, T.; Harrison, B.L.; Malamas, M.S.; Brandon, N.J.; Kronbach, T. "Discovery of imidazo[1,5-a]pyrido[3,2-e]pyrazines as a new class of phosphodiesterase 10A inhibitors" *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4399-4411.

¹⁰² Malamas, M.S.; Ni, Y.; Erdei, J.; Stange, H.; Schindler, R.; Lankau, H.J.; Grunwald, C.; Fan, K.Y.; Parris, K.; Langen, B.; Egerland, U.; Hage, T.; Marquis, K.L.; Grauer, S.; Brennan, J.; Navarra, R.; Graf, R.; Harrison, B.L.; Robichaud, A.; Kronbach, T.; Pangalos, M.N.; Höfgen, N.; Brandon, N.J. "Highly potent, selective, and orally active phosphodiesterase 10A inhibitors" *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7621-7638.

¹⁰³ Asproni, B.; Murineddu, G.; Pau, A.; Pinna, G.A.; Langgard, M.; Christoffersen, C.T.; Nielsen, J.; Kehler, J. "Synthesis and SAR study of new phenylimidazole-pyrazolo[1,5-c]quinazolines as potent phosphodiesterase 10A inhibitors" *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 642-649.

¹⁰⁴ McElroy, W.T.; Tan, Z.; Basu, K.; Yang, S.W.; Smotryski, J.; Ho, G.D.; Tulshian, D.; Greenlee, W.J.; Mullins, D.; Guzzi, M.; Zhang, X.; Bleickardt, C.; Hodgson, R. "Pyrazoloquinolines as PDE10A inhibitors: discovery of a tool compound" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1335-1339.

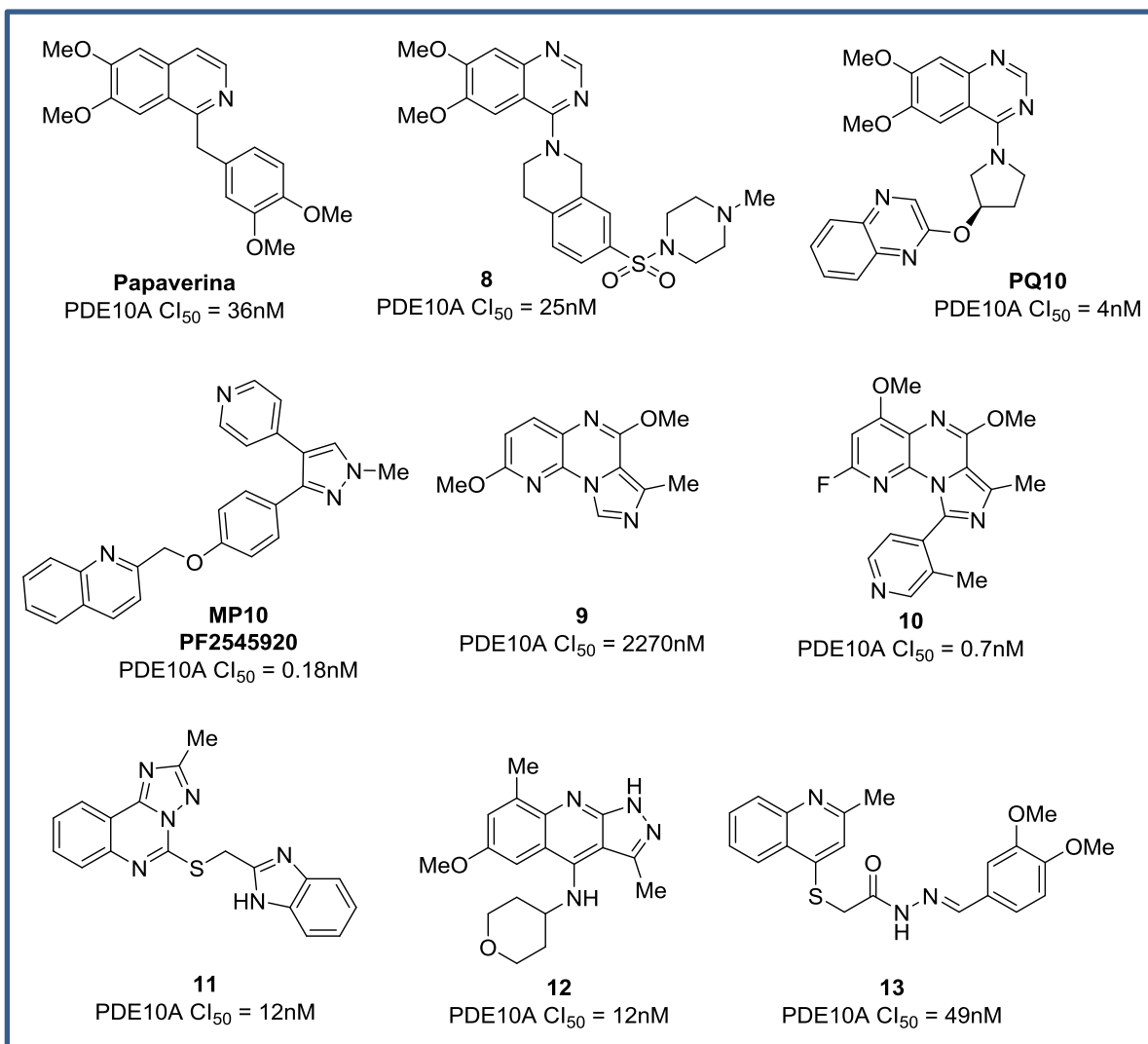


Figura 11. Inhibidores de PDE10A.

Por su parte, Omeros identificó en una de estas campañas el derivado de *N*-acilhidrazona **13**¹⁰⁵, que tras un arduo trabajo de optimización ha proporcionado el derivado OMS824, que a día de hoy ha completado con éxito la fase clínica I indicado como fármaco para enfermedades del sistema nervioso central. Además, como parte de los estudios de fase I, se ha evaluado el nivel de interacción con PDE10A en estriado a través de tomografía de emisión de positrones (PET). Actualmente, la fase II está en curso indicado para el tratamiento de la esquizofrenia¹⁰⁶.

¹⁰⁵ Gage, J.L.; Onrust, R.; Johnston, D.; Osnowski, A.; Macdonald, W.; Mitchell, L.; Urogdi, L.; Rohde, A.; Harbol, K.; Gragerov, S.; Dorman, G.; Wheeler, T.; Florio, V.; Cutshall, N.S. "*N*-Acylhydrazones as inhibitors of PDE10A" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 4155-4159.

¹⁰⁶ Ensayos clínicos OMS824 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01952132?term=OMS824&rank=2>)

La eficacia mostrada por algunos de los inhibidores de PDEs expresadas en cerebro en diversos modelos animales de enfermedades neurodegenerativas y los estudios de algunos de ellos en fases clínicas I y II en humanos, pone de manifiesto el gran potencial de estas enzimas para el tratamiento de este tipo de patologías. Además, dado que a día de hoy estas enfermedades no tienen un tratamiento eficaz, existiendo únicamente tratamientos de tipo paliativo, el desarrollo de nuevos inhibidores de PDEs puede considerarse una estrategia novedosa y prometedora en la búsqueda de un posible tratamiento modificador de la neurodegeneración.

OBJETIVOS

A día de hoy, las enfermedades neurodegenerativas carecen de un tratamiento eficaz capaz de frenar la muerte neuronal que las caracteriza. Teniendo en cuenta la necesidad urgente de tratamientos modificadores del proceso neurodegenerativo así como del posible papel terapéutico que la inhibición de las fosfodiesterasas de AMPc expresadas en el sistema nervioso central puedan tener, se propone en este trabajo el desarrollo de nuevos inhibidores de PDE7, 8 y 10 que puedan ser útiles para la validación de estas dianas farmacológicas así como para el tratamiento de este tipo de patologías.

El diferente grado de desarrollo de estas PDEs como dianas terapéuticas en relación a las enfermedades seleccionadas hace que los objetivos concretos que se proponen en esta tesis doctoral sean:

1. Dado que PDE7 ya ha sido validada como diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, se proponen como objetivos en relación a esta diana:
 - 1.1. Sintetizar inhibidores de PDE7 de reemplazo para el inhibidor de PDE7 que actualmente está en desarrollo preclínico, con el fin de garantizar el éxito final del programa.
 - 1.2. Aumentar la diversidad química entre los inhibidores de PDE7 con el fin de tener un mayor número de candidatos a fármacos con este mecanismo de acción novedoso.
 - 1.3. Demostrar que los inhibidores de PDE7 no presentan efectos eméticos como los asociados al empleo de inhibidores de PDE4, fortaleciendo la utilidad terapéutica de estos nuevos fármacos.
2. Validación de PDE10A como diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad del Parkinson, en modelos *in vitro* e *in vivo* de la enfermedad de Parkinson.
 - 2.1. Diseño y síntesis de nuevos inhibidores de PDE10 estructuralmente diversos que serán estudiados como potenciales candidatos a fármacos.
3. Inicio de la validación de PDE8 como diana terapéutica para enfermedades neurodegenerativas mediante el diseño de una nueva familia de inhibidores de PDE8, y preparación de los mismos mediante técnicas de síntesis en fase sólida.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. FOSFODIESTERASA 7 COMO DIANA TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

1.1. Antecedentes

En nuestro grupo de investigación tenemos una larga experiencia en la búsqueda y desarrollo de inhibidores de PDE7, así como en su aplicación en diferentes patologías del SNC. El primer trabajo, publicado en el año 2000, describía los derivados de benzotiadiazina y benzotienotiadiazina como los primeros heterociclos descritos con capacidad inhibitoria de PDE7⁵⁰. Posteriormente, mediante un cribado virtual por semejanza realizado a partir de uno de los derivados de tiadiazina, utilizando los descriptores generados por el programa CODES⁵⁹, se identificaron los derivados de tioxoquinazolina como una nueva clase de inhibidores con una menor complejidad química que los anteriormente desarrollados, pero que mantenían la capacidad de inhibición. Tras realizar diferentes modificaciones en la estructura de tioxoquinazolina¹⁰⁷, debido a los largos tiempos de reacción y los bajos rendimientos con los que se obtenían estos derivados, se llevó a cabo la optimización del proceso sintético de estos heterociclos utilizando síntesis orgánica asistida por microondas (MAOS)¹⁰⁸. Así, se pasó de un procedimiento que requería un tiempo de reacción de varios días a reflujo de tolueno a otro que, gracias al empleo de la radiación microondas, permitía obtener estos derivados calentando durante 40 minutos a 120 °C con buenos rendimientos (**figura 12**).

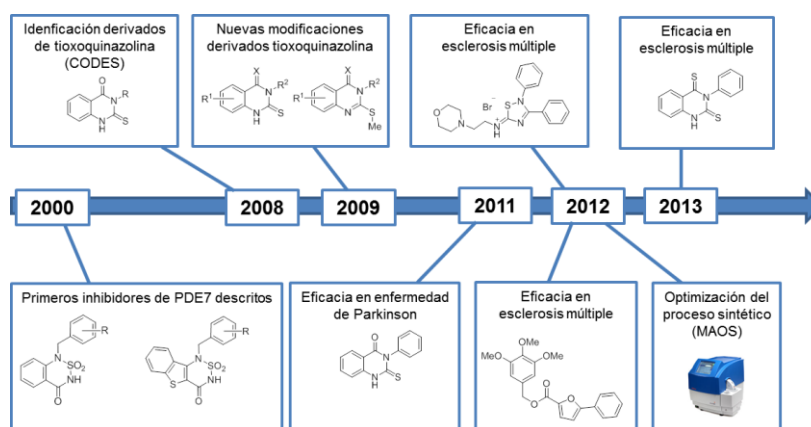


Figura 12. Trabajo en inhibidores de PDE7 en nuestro grupo de investigación.

¹⁰⁷ Castaño, T.; Wang, H.; Campillo, N.E.; Ballester, S.; Gonzalez-Garcia, C.; Hernandez, J.; Perez, C.; Cuenca, J.; Perez-Castillo, A.; Martinez, A.; Huertas, O.; Gelpi, J. L.; Luque, F.J.; Ke, H.; Gil, C. "Synthesis, structural analysis, and biological evaluation of thioxoquinazoline derivatives as phosphodiesterase 7 inhibitors" *ChemMedChem* **2009**, *4*, 866-876.

¹⁰⁸ Redondo, M.; Zarruk, J. G.; Ceballos, P.; Perez, D.I.; Perez, C.; Perez-Castillo, A.; Moro, M.A.; Brea, J.; Val, C.; Cadavid, M. I.; Loza, M.I.; Campillo, N.E.; Martinez, A.; Gil, C. "Neuroprotective efficacy of quinazoline type phosphodiesterase 7 inhibitors in cellular cultures and experimental stroke model" *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *47*, 175-185.

Las modificaciones estructurales realizadas hasta el momento en los inhibidores de PDE7 pertenecientes a la familia de las tioxoquinazolininas se muestran en la **figura 13**. Así, se introdujeron diferentes sustituyentes R^1 y R^2 en los anillos de benceno, cambiando también el anillo de benceno fusionado por otros heterociclos como piridina o tiofeno, e introduciendo otros ciclos como piperidina o morfolina en la posición 3. Además, también se llevó a cabo la sustitución del átomo de oxígeno de la posición 4 de esta estructura por azufre; y la metilación del azufre en la posición 2 de la tioxoquinazolinina.

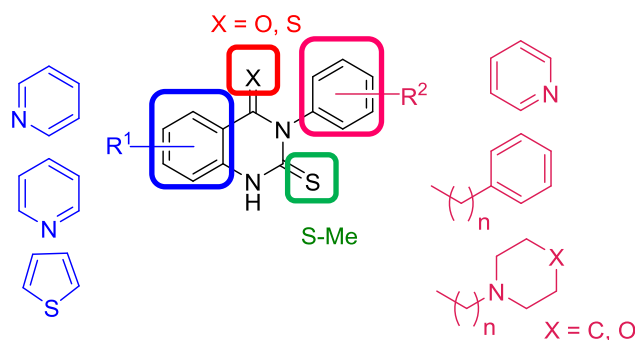


Figura 13. Modificaciones químicas realizadas en el esqueleto de tioxoquinazolinina.

En cuanto al potencial terapéutico de estos inhibidores, podemos destacar, dentro de la familia de las tioxoquinazolininas, los derivados conocidos como **S14** (3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolinina) y **TC3.6** (3-fenil-2,4-ditioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolinina) por haber demostrado eficacia en diversos modelos de enfermedades neurodegenerativas (**figura 12**).

Así, **S14** presentó un efecto neuroprotector en células SH-SY5Y dañadas con 6-OHDA, modelo *in vitro* de la enfermedad de Parkinson, disminuyendo además la activación inflamatoria inducida por LPS en cultivos primarios de astrocitos y microglía. Su administración junto con LPS, lipopolisacárido que causa la muerte de las neuronas dopaminérgicas en un modelo animal, mostró una reducción de esta muerte neuronal respecto al control. Por último, y muy importante, se descubrió que el efecto neuroprotector ejercido por esta molécula desaparecía al bloquear la ruta de activación de la proteína PKA a través del AMPc, lo cual demostró por primera vez que la inhibición de PDE7 conduce a la protección de neuronas dopaminérgicas y que, por lo tanto, constituye una estrategia terapéutica novedosa para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson¹⁰⁹. De hecho, tal y como se ha comentado en la introducción de este trabajo, **S14** se encuentra actualmente en fase de desarrollo toxicológico regulatorio con el fin de

¹⁰⁹ Morales-García, J.A.; Redondo, M.; Alonso-Gil, S.; Gil, C.; Pérez, C.; Martínez, A.; Santos, A.; Pérez-Castillo, A. "Phosphodiesterase 7 inhibition preserves dopaminergic neurons in cellular and rodent models of Parkinson disease" *PLoS One* **2011**, 6, e17240.

entrar en fases clínicas para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. En cuanto a **TC3.6**, se ha mostrado su eficacia en un modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), empleado para estudiar posibles fármacos para el tratamiento de la esclerosis múltiple⁶⁵, mostrando el importante papel que la inhibición de PDE7 juega en esta enfermedad.

Otra familia de inhibidores de PDE7 desarrollada en nuestro grupo de investigación, los derivados de iminotiadiazol, han mostrado también un gran potencial en el modelo animal de EAE⁶³ (**figura 12**).

Por otro lado, un derivado de furano de una familia identificada como inhibidores de PDE7 a partir de un modelo de farmacóforo desarrollado previamente en nuestro grupo de investigación, ha mostrado una mejora de la sintomatología en el modelo de roedor de EAE⁶⁴, confirmando el papel de los inhibidores de PDE7 en la esclerosis múltiple (**figura 12**).

Basándonos en la eficacia mostrada por estas familias de inhibidores de PDE7 en modelos de la enfermedad de Parkinson y la esclerosis múltiple, así como en modelos de otras enfermedades neurodegenerativas^{110,111}, el presente capítulo centrado en esta diana se divide en dos partes:

- Nuevas modificaciones estructurales llevadas a cabo en los derivados de tioxoquinazolina con el fin de proporcionar una serie de compuestos de reemplazo para el candidato **S14**.
- Desarrollo de una nueva familia de inhibidores de PDE7 identificada a partir de un cribado fenotípico, estudiándose la ausencia de efectos eméticos asociados a la inhibición de esta enzima.

1.2. Derivados de tioxoquinazolina

1.2.1. Diseño de nuevos derivados de tioxoquinazolina S-alquilados

En 2009, se publicó el complejo cristalográfico de uno de los derivados de tioxoquinazolina S-metilado, la 3-(2,6-difluorofenil)-2-metiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (**TC2.43**, $Cl_{50} = 4.68 \mu M$), junto con el dominio catalítico de PDE7A¹⁰⁷. Según el modo de unión de este compuesto en el cristal (**figura 14A**), existían dos interacciones aromáticas importantes entre el anillo fusionado de la tioxoquinazolina y los residuos de Phe416 y

¹¹⁰ Paterniti, I.; Mazzon, E.; Gil, C.; Impellizzeri, D.; Palomo, V.; Redondo, M.; Perez, D.I.; Esposito, E.; Martinez, A.; Cuzzocrea, S. "PDE7 inhibitors: new potential drugs for the therapy of spinal cord injury" *PLoS One* **2011**, 6, e15937.

¹¹¹ Perez-Gonzalez, R.; Pascual, C.; Desiree, A.; Marta, B.; Redondo, M.; Perez, D.I.; Perez-Grijalba, V.; Krzyzanowska, A.; Sarasa, M.; Gil, C.; Ferrer, I.; Martinez, A.; Carro, E. "Phosphodiesterase 7 inhibitor reduced cognitive impairment and pathological hallmarks in a mouse model of Alzheimer's disease" *Neurobiol. Aging*, **2013** 34, 2133-2145.

Phe384 de la enzima. Además, el resto metilo presente en el azufre estaba orientado hacia una zona formada por aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos tales como Leu, Val, Phe, Trp, entre otros.

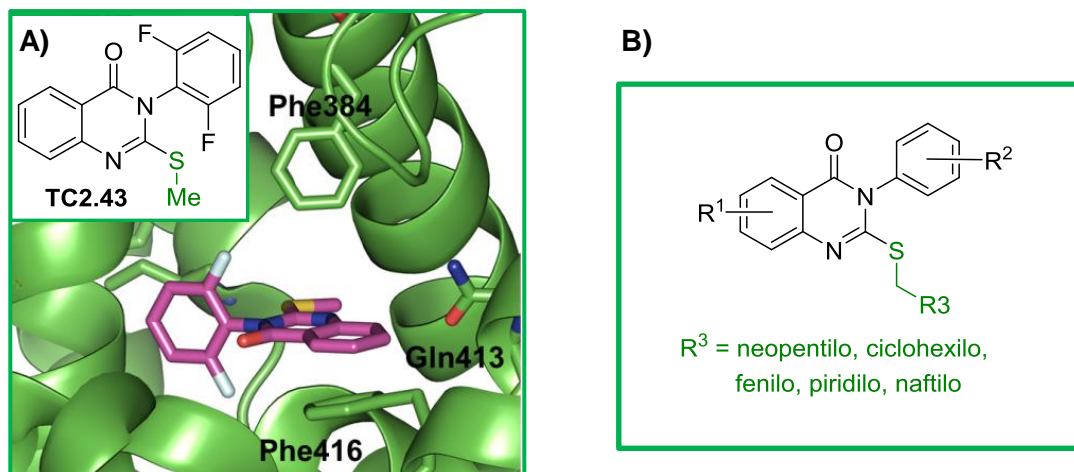


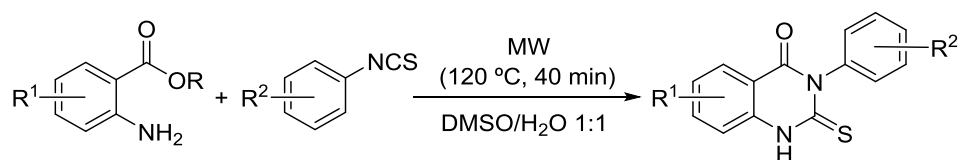
Figura 14. (A) Complejo cristalográfico del inhibidor **TC2.43**-PDE7A (código PDB: 3G3N). **(B)** Derivados S-alquilados propuestos.

Con el fin de potenciar las interacciones con la enzima en esa zona, se decidieron explorar nuevas sustituciones en esa parte de la molécula, tales como restos alquílicos más voluminosos o bien restos aromáticos, de tal manera que estos nuevos sustituyentes proporcionasen compuestos con mayor capacidad inhibitoria que los correspondientes derivados sin alquilar. Se seleccionaron como sustituyentes a introducir en R³ los restos neopentilo, ciclohexilo, piridilo o naftilo (**figura 14B**).

1.2.2. Síntesis de los nuevos derivados de tioxoquinazolina empleando MAOS

Para sintetizar los derivados propuestos, en primer lugar se obtuvo la tioxoquinazolina de partida correspondiente, y, posteriormente, se llevó a cabo la alquilación en el azufre utilizando diferentes bromuros de alquilo y arilo en cada caso.

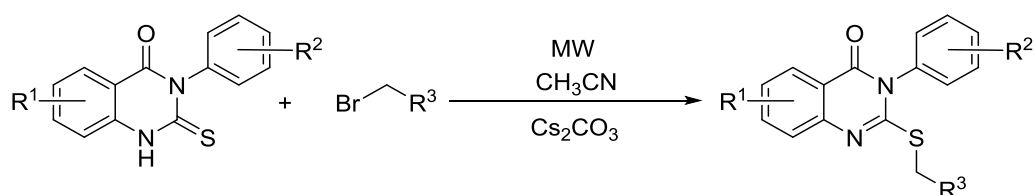
Las tioxoquinazolininas de partida se sintetizaron mediante la ciclación de los correspondientes derivados de ácido antranílico o antranilato de metilo, respectivamente, con el correspondiente isotiocianato, empleando para ello MAOS tal y como se había descrito previamente¹⁰⁸. Mediante este procedimiento se sintetizaron los derivados ya descritos **S14**, **14** y **17**, así como tres nuevos derivados (**15**, **16** y **18**), empleándose como disolvente una mezcla DMSO/H₂O 1:1, calentando la mezcla de reacción durante 40 minutos a 120 °C bajo irradiación de microondas (**esquema 1**).



| | | | Rto. |
|------|---------------------------|----------------------|----------------|
| R=Me | R ¹ =H | R ² =H | S14 70% |
| R=H | R ¹ =6-Br | R ² =H | 14 60% |
| R=H | R ¹ =8-Cl | R ² =H | 15 27% |
| R=Me | R ¹ =H | R ² =2-Me | 16 98% |
| R=Me | R ¹ =6,7-diMeO | R ² =H | 17 63% |
| R=H | R ¹ =7-Cl | R ² =H | 18 65% |

Esquema 1. Síntesis de las tioxoquinazolinas **S14**, **14-18**.

A continuación, se llevó a cabo la alquilación del azufre de los derivados ciclados sintetizados introduciendo los restos neopentilo, ciclohexilmetilo, 2-, 3- y 4-piridilmetilo y 2-naftilmetilo. Todos los derivados *S*-alquilados sintetizados (**19-31**) se muestran en el **esquema 2**.



| | | | | Rto. A | Rto. B |
|------------|---------------------------|----------------------|----------------------------------|---------------|--------|
| S14 | R ¹ =H | R ² =H | R ³ = ^t Bu | 19 40% | - |
| | | | R ³ =2-Py | 20 57% | 74% |
| | | | R ³ =3-Py | 21 46% | 77% |
| | | | R ³ =4-Py | 22 47% | 94% |
| | | | R ³ =2-Naph | 23 19% | 30% |
| 14 | R ¹ =6-Br | R ² =H | R ³ = ^t Bu | 24 20% | - |
| | | | R ³ =Cy | 25 17% | - |
| 15 | R ¹ =8-Cl | R ² =H | R ³ = ^t Bu | 26 30% | - |
| | | | R ³ =3-Py | 27 22% | - |
| 16 | R ¹ =H | R ² =2-Me | R ³ = ^t Bu | 28 44% | - |
| | | | R ³ =3-Py | 29 12% | 41% |
| 17 | R ¹ =6,7-diMeO | R ² =H | R ³ = ^t Bu | 30 20% | - |
| 18 | R ¹ =7-Cl | R ² =H | R ³ = ^t Bu | 31 54% | - |

Esquema 2. Síntesis de las tioxoquinazolinas *S*-alquiladas **19-31**.

Inicialmente, la reacción de S-alquilación se llevó a cabo en una sola etapa, utilizando acetonitrilo como disolvente y calentando la mezcla de reacción bajo irradiación de microondas a una temperatura de 150 °C, durante un tiempo que oscilaba entre 2-3 horas (Método A). En algunos casos, los rendimientos obtenidos no eran muy buenos, y con el fin de mejorarlos, se pensó en llevar a cabo la reacción en dos etapas: en la primera, se activaba la tioxoquinazolina de partida con la base para favorecer el ataque nucleófilo y, en una segunda etapa, se añadía el agente alquilante requerido (Método B). Así, se preparó una disolución del producto de partida con el carbonato de cesio en acetonitrilo y se agitó durante 30 minutos a 80 °C bajo irradiación microondas. A continuación, se añadió el agente alquilante, agitando durante otros 30 minutos en las mismas condiciones (**esquema 2**).

La asignación estructural de todos los nuevos derivados de tioxoquinazolina sintetizados (**15-31**) fue establecida en base a los datos analíticos y espectroscópicos de resonancia magnética nuclear tanto de ^1H como de ^{13}C , tal y como se recoge en la parte experimental.

1.2.3. Evaluación enzimática

Todos los derivados sintetizados fueron evaluados frente a la enzima PDE7A1 en colaboración con el grupo de las Profesoras M^a Isabel Cadavid y M^a Isabel Loza en la Universidad de Santiago de Compostela empleando un ensayo radiométrico a partir de la co-incubación del enzima recombinante humano PDE7A con el ^3H -AMPc, siguiendo el procedimiento descrito¹⁰⁸. Los compuestos se evaluaron inicialmente a una concentración de 10 μM , calculándose el porcentaje de inhibición en PDE7A (**tabla 2**). En aquellos compuestos con un porcentaje de inhibición de PDE7A superior al 60%, se determinó la curva dosis-respuesta, calculándose la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) para cada uno de ellos. En esta evaluación enzimática se empleó como control el inhibidor comercial de PDE7 denominado **BRL50481** (**tabla 2**). A la vista de los resultados, se observa, que los compuestos obtenidos a partir de la S-alquilación con los diferentes bromuros de alquilo del derivado **S14**, son notablemente más activos que éste compuesto, casi todos ellos con actividad submicromolar (**19, 20, 21**), o incluso actividad nanomolar en el caso del grupo naftilo (**23**), lo cual confirmaría la mejora de la actividad gracias a las posibles interacciones con la enzima en base a las cuales se diseñaron estos compuestos. Por otro lado, se observa como los derivados no alquilados que presentan sustituciones en las posiciones 6 y 7 del anillo aromático fusionado (**14, 17, 18**), así como sus correspondientes derivados S-alquilados (**24, 25, 30, 31**), no son capaces de inhibir a la

enzima. Por tanto, con estos datos de actividad enzimática podría concluirse que se han obtenido en este trabajo nuevos derivados de la familia de tioquinazolinas estudiados como inhibidores de PDE7 donde, gracias a la alquilación del átomo de azufre con un resto alifático voluminoso o aromático, se han potenciado las interacciones con dicha enzima y, por tanto, se ha incrementado la capacidad inhibitoria frente a la misma.

Tabla 2. Valores de inhibición enzimática frente a PDE7A de los compuestos sintetizados (**S14**, **14-31**) junto con los compuestos de referencia **BRL50481** y **S14**. Los porcentajes de inhibición fueron calculados inicialmente a una concentración de compuesto de 10 μ M.

| Compuesto | PDE7A %inh @10 μ M | PDE7A CI ₅₀ (μ M) | Compuesto | PDE7A %inh @10 μ M | PDE7A CI ₅₀ (μ M) |
|-----------------|---------------------------|--------------------------------------|-----------|---------------------------|--------------------------------------|
| BRL50481 | | 0.03 | 22 | 91.8 \pm 1.2 | 2.60 |
| S14 | | 4.68 | 23 | 80.3 \pm 1.6 | 0.09 |
| 14 | 8.9 \pm 2.6 | - | 24 | 51.8 \pm 0.3 | - |
| 15 | 13.2 \pm 1.0 | - | 25 | 34.2 \pm 7.1 | - |
| 16 | 95.5 \pm 1.8 | 0.80 | 26 | 77.1 \pm 1.1 | 1.20 |
| 17 | 36.6 \pm 1.2 | - | 27 | 91.3 \pm 0.4 | 0.54 |
| 18 | 12.2 \pm 5.5 | - | 28 | 87.5 \pm 0.2 | 1.85 |
| 19 | 87.0 \pm 5.2 | 0.10 | 29 | 94.5 \pm 0.3 | 0.12 |
| 20 | 67.6 \pm 1.1 | 0.80 | 30 | 35.7 \pm 1.5 | - |
| 21 | 88.5 \pm 0.3 | 0.70 | 31 | 32.1 \pm 1.6 | - |

1.2.4. Predicción del paso de barrera hematoencefálica

El desarrollo de nuevos candidatos destinados al tratamiento de enfermedades neurológicas se basa no sólo en su buena potencia de inhibición frente a la enzima deseada, sino también en las propiedades tipo fármaco que estos compuestos presenten, ya que deben ser capaces de atravesar la BHE para llegar al cerebro y alcanzar las dianas de interés. La BHE es una estructura compleja constituida por células endoteliales de la red capilar del SNC. En los mamíferos, la BHE regula y restringe el acceso al parénquima nervioso de múltiples sustancias y moléculas que circulan en la sangre, para mantener la homeostasis del microambiente químico del SNC (**figura 15**). Si bien determinadas sustancias necesitan de un transportador para atravesar esta barrera (transporte activo), la mayoría de los fármacos entran en el SNC mediante difusión pasiva, debido al gradiente de concentración que se establece entre el torrente sanguíneo y el cerebro¹¹². Está claro que, aunque esta membrana constituye un mecanismo de defensa ante la entrada de sustancias tóxicas al cerebro, también supone una dificultad para el

¹¹² Di, L.; Kerns, E.H.; Carter, G.T. "Strategies to assess blood-brain barrier penetration" *Expert Opin. Drug Discov.* **2008**, 3, 677-687.

paso de fármacos destinados al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, donde la diana de interés se encuentra en el cerebro.

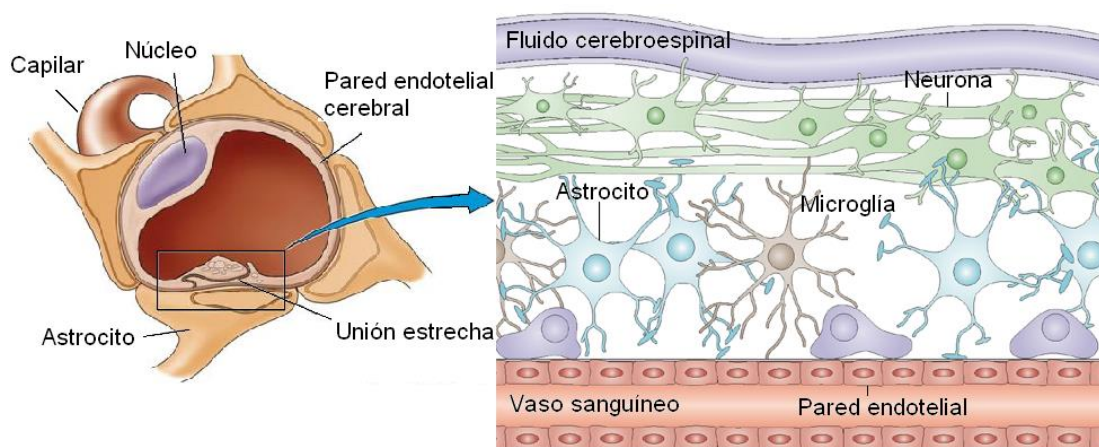


Figura 15. Barrera hematoencefálica.

Dada la importancia de que los fármacos destinados al tratamiento de este tipo de patologías sean capaces de atravesar esta barrera, se han desarrollado técnicas para poder predecir el paso de la misma en fases tempranas del desarrollo de un determinado candidato a fármaco. Una de ellas es la metodología denominada PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*), desarrollada para predecir *in vitro* la permeabilidad pasiva a través de membranas biológicas, descrita por primera vez por Di y colaboradores¹¹³, y posteriormente puesta a punto en nuestro grupo de investigación para moléculas orgánicas con solubilidad acuosa limitada¹¹⁴. Esta metodología está basada en la capacidad de un compuesto para atravesar una membrana artificial impregnada de un lípido de cerebro porcino desde la placa donadora que contiene el tampón a un determinado pH y el fármaco a evaluar hasta la placa aceptora que únicamente contiene el tampón. Así, se determina la permeabilidad efectiva (P_e) de cada compuesto a partir de la diferencia entre los valores de absorbancia obtenidos en la placa donadora y aceptora (figura 16).

¹¹³ Di, L.; Kerns, E.H.; Fan, K.; McConnell, O.J.; Carter, G.T. "High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier" *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, 38, 223-232.

¹¹⁴ Pérez, D.I.; Pistolozzi, M.; Palomo, V.; Redondo, M.; Fortugno, C.; Gil, C.; Felix, G.; Martinez, A.; Bertucci, C. "5-Imino-1,2,4-thiadiazoles and quinazolines derivatives as glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) and phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors: determination of blood-brain barrier penetration and binding to human serum albumin" *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, 45, 677-684.

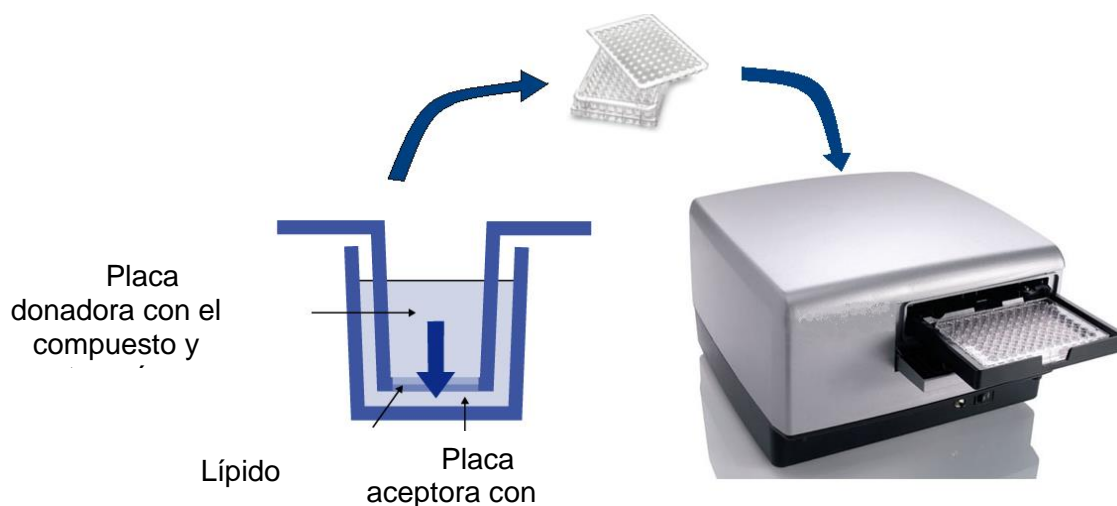


Figura 16. Representación del experimento PAMPA.

Siguiendo esta metodología, los derivados de tioquinazolina seleccionados fueron ensayados disueltos en una mezcla de tampón fosfato salino (PBS) a pH 7.4 y etanol en proporción 70:30. El método utilizado se validó ensayando en las mismas condiciones diez fármacos comerciales de los cuales se conoce su capacidad de penetración en el SNC, obteniéndose una buena correlación lineal entre la permeabilidad experimental y la descrita (**figura 17**).

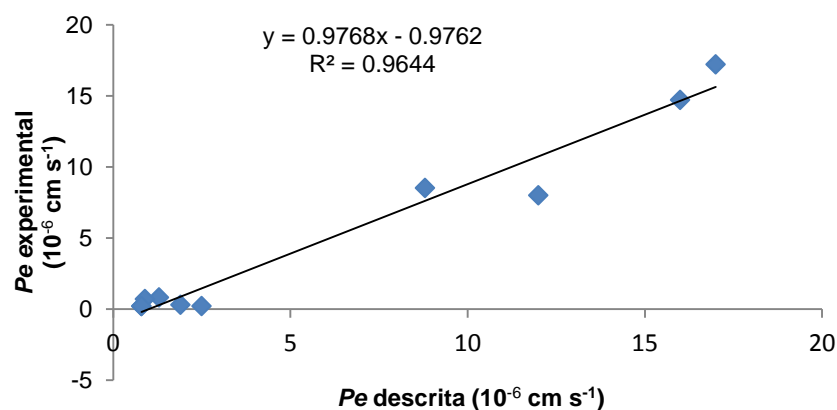


Figura 17. Recta de correlación entre los valores experimentales y descritos para la permeabilidad efectiva de fármacos comerciales usando el ensayo PAMPA-BHE.

Los experimentos se realizaron por triplicado de acuerdo con el procedimiento descrito en la parte experimental. Los resultados se expresan como el valor medio de tres ensayos independientes conteniendo cada uno de ellos tres repeticiones de cada compuesto. A partir de la recta de correlación anterior, siguiendo la metodología

descrita¹¹⁵, se calculó el valor de Pe $2.9 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$ como valor límite a partir del cual los compuestos se considerarían capaces de atravesar la barrera (SNC+). Sin embargo, se consideró que aquellos compuestos con valores de Pe por debajo de $1.0 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ no la atravesarían (SNC-). Los valores comprendidos entre estos dos límites se encuentran en la zona de incertidumbre y, por tanto, se considera permeabilidad incierta (SNC+/-) (**tabla 3**).

Puede observarse que todos los nuevos derivados de quinazolina activos que pudieron ser evaluados por este método serían permeables a la BHE, si bien en el caso de los derivados **23** y **26**, no se pudo predecir dicha permeabilidad puesto que resultaron ser insolubles en la mezcla PBS/etanol utilizada en el ensayo.

Tabla 3. Datos obtenidos del ensayo PAMPA-BHE (Pe $10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) para los derivados de tioxoquinazolina ensayados.

| Compuesto | Pe experimental | Pe bibliografía | PAMPA-BHE |
|----------------|-------------------|-------------------|-----------|
| Atenolol | 0.2±0.1 | 0.8 | |
| Cafeína | 0.8±0.1 | 1.3 | |
| Desipramino | 8.0±1.0 | 12 | |
| Enoxacino | 0.7±0.2 | 0.9 | |
| Hidrocortisona | 0.3±0.1 | 1.9 | |
| Ofloxacino | 0.2±0.1 | 0.8 | |
| Piroxicam | 0.9±0.1 | 2.5 | |
| Promazina | 8.5±0.1 | 8.8 | |
| Testosterona | 17.2±0.6 | 17 | |
| Verapamilo | 14.7±1.1 | 16 | |
| 16 | 9.8±0.7 | | SNC+ |
| 20 | 12.4±2.2 | | SNC+ |
| 21 | 18.6±1.7 | | SNC+ |
| 22 | 15.9±1.3 | | SNC+ |
| 27 | 12.1±3.9 | | SNC+ |
| 28 | 3.9±0.7 | | SNC+ |
| 29 | 20.1±0.1 | | SNC+ |

1.2.5. Evaluación de los nuevos derivados de tioxoquinazolina en un modelo *in vitro* de la enfermedad de Parkinson

Puesto que algunos de estos compuestos pertenecientes a la familia de las tioxoquinazolinas presentaron buenos valores de inhibición en PDE7 y serían, a priori, permeables a la BHE, podrían ser considerados compuestos de reemplazo para el

¹¹⁵ Crivori, P.; Cruciani, G.; Carrupt, P.A.; Testa, B. "Predicting blood-brain barrier permeation from three-dimensional molecular structure" *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 2204-2216.

candidato **S14** en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Por ello, se decidió ensayarlos en uno de los modelos celulares más ampliamente utilizados para el estudio de esta patología. Este modelo se basa en el empleo de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, tratada con 6-OHDA, neurotoxina que causa la muerte celular¹¹⁶. Así, se seleccionaron los derivados con un valor de Cl_{50} por debajo de 1 μM (**18**, **19**, **20**, **21**, **23**, **27** y **29**) con el fin de evaluarlos en este modelo. Estos ensayos fueron llevados a cabo en colaboración con el grupo de la Profesora Ana Pérez Castillo (IIB-CSIC), que también se encargó de realizar los estudios en cultivos primarios descritos en el siguiente apartado. Tras 24 horas de incubación con 6-OHDA, en presencia o ausencia de cada uno de los compuestos seleccionados, se midió la viabilidad celular mediante un ensayo con MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetil-2-thiazolil]-2,5-difenil tetrazolio), ya que éste se reduce a Formazán en el interior de las mitocondrias, pudiendo ser cuantificado espectrofotométricamente a la longitud de onda de 570 nm. Así, la cantidad de Formazán producido es proporcional al número de células metabólicamente activas (**figura 18**).

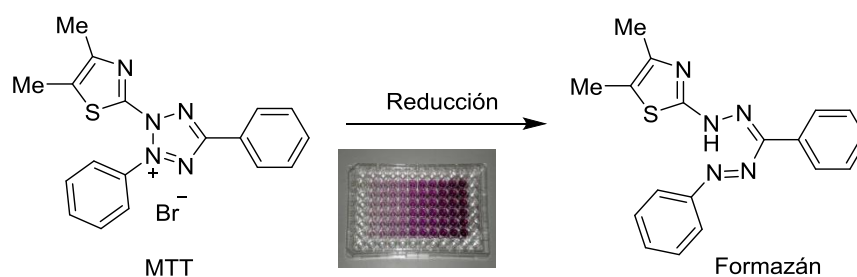


Figura 18. Reacción de reducción del MTT a Formazán¹¹⁷.

Los resultados de este experimento muestran que los compuestos **18**, **19**, **21** y **29** fueron capaces de aumentar la supervivencia celular de manera significativa cuando se administraban junto con 6-OHDA (**figura 19**).

¹¹⁶ Takahashi, T.; Deng Y.; Maruyama, W.; Dostert, P.; Kawai, M.; Naoi, M. "Uptake of a neurotoxin-candidate, (R)-1,2-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells by dopamine transport system" *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* **1994**, 98, 107-118.

¹¹⁷ Berridge, M.V.; Herst, P.M.; Tan, A.S. "Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction" *Biotechnol. Annu. Rev.* **2005**, 11, 127-152.

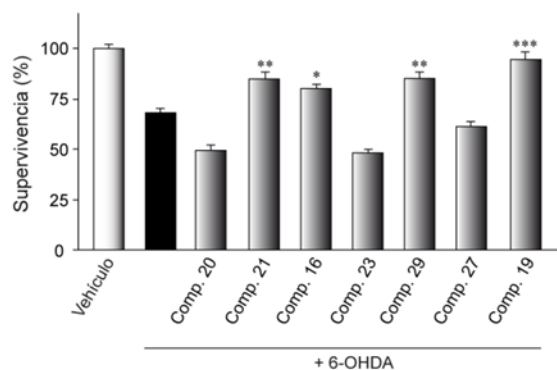


Figura 19. Medida de la supervivencia celular en células de la línea SH-SY5Y expuestas a 6-OHDA en presencia o ausencia de inhibidores de PDE7A de la familia de las tioxoquinazolininas. *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$.

1.2.6. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los nuevos derivados de tioxoquinazolina

Por otro lado, es bien conocido el papel que juega el AMPc en el proceso neuroinflamatorio presente en la enfermedad de Parkinson³⁴, por lo que un aumento de los niveles de este nucleótido gracias a la inhibición de PDE7 constituye un mecanismo protector frente a dicha inflamación neuronal. Así, con el fin de demostrar la utilidad terapéutica de los inhibidores de PDE7 de esta familia para el tratamiento de ésta y otras enfermedades neurodegenerativas, en las que también está presente la inflamación neuronal, se evaluaron sus propiedades antiinflamatorias en diferentes células pertenecientes al SNC. Se emplearon para este estudio cultivos primarios de astrocitos y microglía en los que se causaba el daño inflamatorio empleando LPS, lipopolisacárido presente en la pared de algunas bacterias que es capaz de inducir inflamación. En este experimento, las células se incubaron durante 1 hora en presencia de los inhibidores de PDE7 de la familia de las tioxoquinazolininas seleccionados, cuya CI_{50} era menor de 1 μM (**18**, **19**, **20**, **21**, **23**, **27** y **29**) y, a continuación, fueron tratadas durante 24 horas con LPS. La capacidad de los inhibidores de PDE7 para proteger frente a la inflamación fue evaluada midiendo la producción de óxido nítrico mediante la reacción de Griess. Cuando se adiciona el conocido como reactivo de Griess¹¹⁸, formado por una mezcla de sulfonamida y *N*-naftiletildiamina en ácido fosfórico, la presencia de nitritos en la muestra hace que se forme una sal de diazonio que reacciona posteriormente con la diamina, tornándose la disolución en un color rosa intenso, que permite la cuantificación de la cantidad de nitritos mediante espectrofotometría ultravioleta (**figura 20**).

¹¹⁸ Stone, W. L.; Yang, H.; Qui, M. "Assays for nitric oxide expression" *Methods Mol. Biol.* **2006**, 315, 245-256.

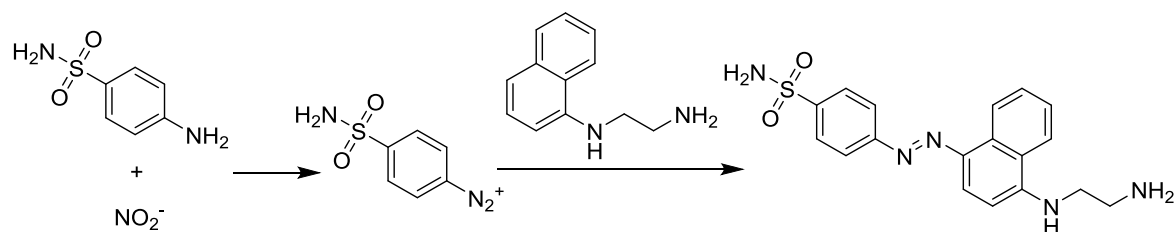


Figura 20. Reacción de Griess¹¹⁸.

Los resultados de este experimento se muestran en la **figura 21**, a partir de los cuales puede concluirse que los inhibidores de PDE7 **18**, **19**, **21** y **29** son capaces de proteger frente al daño inflamatorio causado por el tratamiento con LPS tanto en cultivos primarios de microglía como de astrogía.

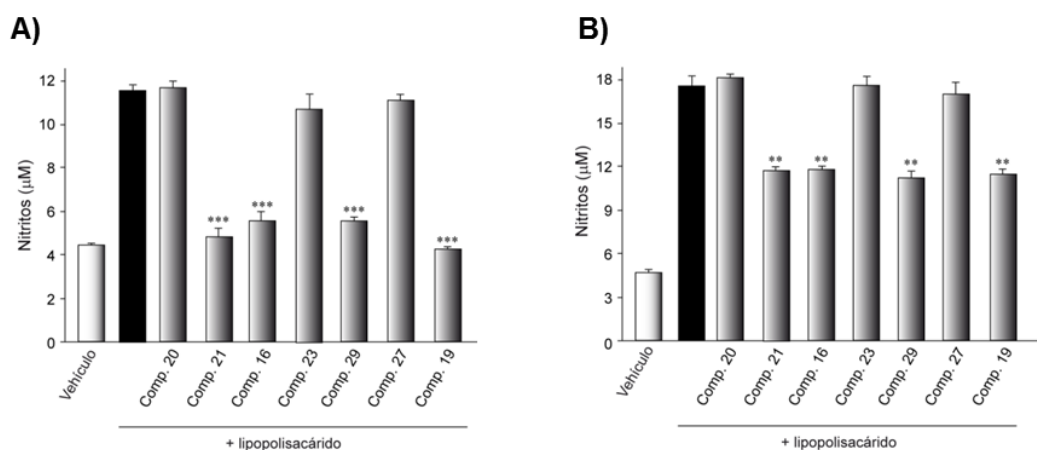


Figura 21. Medida de la producción de nitritos mediante la reacción de Griess en cultivos primarios de astrogía **(A)** y microglía **(B)**, tratado con LPS en presencia o ausencia de los inhibidores de PDE7 de la familia de las tioquinazolin. *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$.

A partir de estos estudios *in vitro*, se podría decir que los resultados obtenidos en estos modelos celulares confirman la posibilidad de considerar los derivados **18**, **19**, **21** y **29** como potenciales compuestos de reemplazo de **S14** para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, ya que presentaron una capacidad inhibitoria del orden submicromolar, resultaron ser, en principio, permeables a la BHE y fueron capaces de aumentar la viabilidad de las células tras el tratamiento con 6-OHDA así como de protegerlas frente al daño inflamatorio causado por el tratamiento con LPS.

1.2.7. Evaluación de la eficacia *in vivo* de los derivados de tioxoquinazolina S-alquilados en un modelo de esclerosis múltiple

De manera adicional, se ha determinado la eficacia de esta nueva familia de quinazolininas S-alquiladas en un modelo murino de EAE, muy utilizado actualmente para el estudio de potenciales fármacos para el tratamiento de la esclerosis múltiple⁶². En éste, los animales desarrollan la enfermedad debido a la inoculación con una emulsión de sustancia blanca combinada con proteína básica de mielina, que desencadena el ataque, mediado por los linfocitos T, hacia las vainas de mielina que recubren los axones. El compuesto elegido fue la quinazolina **19** por ser de las primeras moléculas disponibles de esta nueva serie con un buen perfil farmacológico. Este estudio fue realizado en colaboración con el grupo de la Profesora Guadalupe Mengod (IIBB-CSIC), mostrando una reducción de la sintomatología clínica cuando se administra el compuesto en el pico de la enfermedad de manera crónica durante dos semanas. Estos resultados confirman sin ninguna duda que los inhibidores de PDE7 son unos buenos candidatos para el tratamiento de la esclerosis múltiple, necesitando estudios clínicos que confirmen su desarrollo como posibles fármacos (**figura 22**).

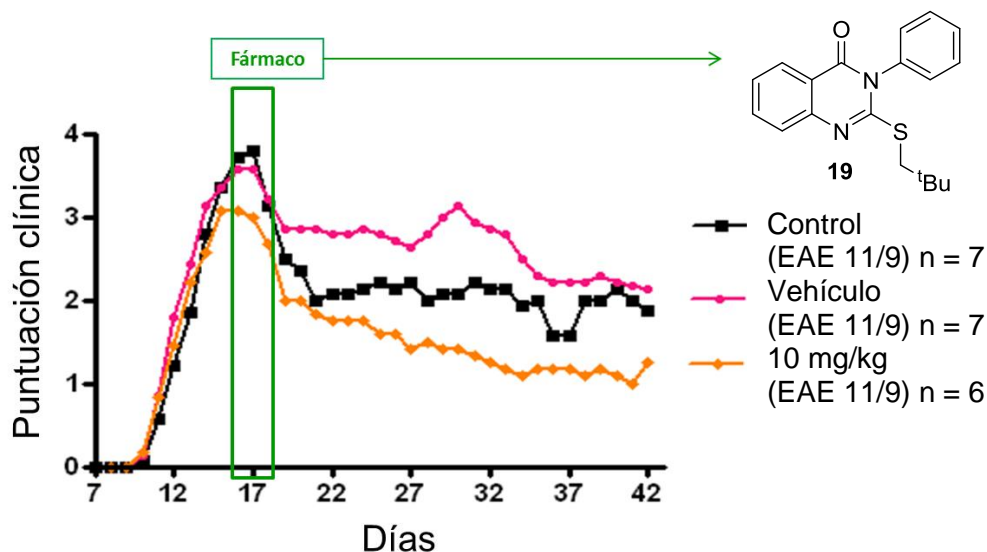


Figura 22. Estudio *in vivo* del compuesto **19** en el modelo de EAE.

1.3. Derivados de diarilsulfuro

1.3.1. Cribado fenotípico para identificar nuevos cabezas de serie para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson

La genética química utiliza moléculas pequeñas para la identificación de nuevos cabezas de serie en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos, y engloba dos posibles aproximaciones: la genética química directa o la genética química inversa¹¹⁹ (**figura 23**). Esta última, basada en la estructura de la diana terapéutica en cuestión, nos permite identificar moléculas capaces de interaccionar con la misma y de las que posteriormente se probará su eficacia en modelos tanto *in vivo* como *in vitro* de la enfermedad que queremos abordar. Sin embargo, las estrategias de genética química directa comienzan con un ensayo fenotípico en un modelo *in vitro* de la enfermedad en cuestión, y permiten identificar moléculas capaces de provocar el cambio fenotípico deseado. Sólo cuando este cambio es observado, se procede a la identificación de la diana terapéutica responsable del mismo. En este tipo de ensayos, una vez seleccionada la línea celular adecuada, se monitoriza un determinado parámetro tal como la muerte o supervivencia celular, o la producción de una proteína o varias proteínas en particular. Esta aproximación constituye hoy en día una fuente importante de descubrimiento de fármacos que presentan un mecanismo de acción novedoso¹²⁰.

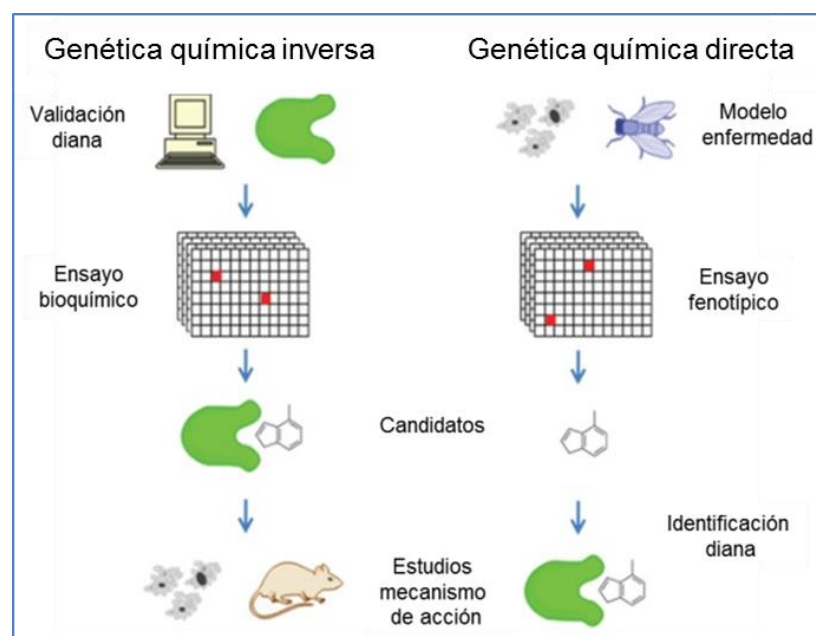


Figura 23. Aproximaciones de la genética química.

¹¹⁹ Lenci, E.; Guarna, A.; Trabocchi, A. "Diversity-oriented synthesis as a tool for chemical genetics" *Molecules* **2014**, *19*, 16506-16528.

¹²⁰ Priest, B.T.; Erdemli, G. "Phenotypic screening in the 21st century" *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*, 264-265.

Así, con el objetivo de identificar nuevas dianas y/o nuevos candidatos para dianas ya identificadas para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, se seleccionaron 450 heterociclos de bajo peso molecular ($PM < 500$) de nuestra quimioteca interna de compuestos, que incluían moléculas con estructuras químicamente diversas, y se llevó a cabo un cribado fenotípico en el modelo de la enfermedad previamente utilizado. Este ensayo fue llevado a cabo en colaboración con el grupo de la Profesora Ana Pérez Castillo (IIB-CSIC). Tras 24 horas de incubación de las células SH-SY5Y con 6-OHDA, en presencia o ausencia de cada uno de los compuestos seleccionados, se midió la supervivencia celular mediante el ensayo con MTT que se ha descrito anteriormente. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado (**figura 24**). Esta representación gráfica muestra la supervivencia celular mostrada por 27 de los compuestos ensayados, de los cuales se seleccionaron aquellos que eran capaces de aumentar dicha supervivencia celular en un porcentaje mayor del 65%, para identificar posteriormente la diana terapéutica responsable de dicho efecto. Con este fin, los compuestos fueron evaluados en experimentos ORAC para medir la actividad antioxidante, en diversas proteínas quinasas tales como GSK-3 β , CK1 δ , CK1 ϵ , LRRK2 y ROCK, y en las fosfodiesterasas PDE3A, PDE4B, PDE4D y PDE7A. En todos los ensayos enzimáticos en los que el porcentaje de inhibición a una concentración de compuesto de 10 μ M era superior al 50%, se calculó la curva dosis-respuesta para obtener así la concentración inhibitoria 50 como medida de la actividad.

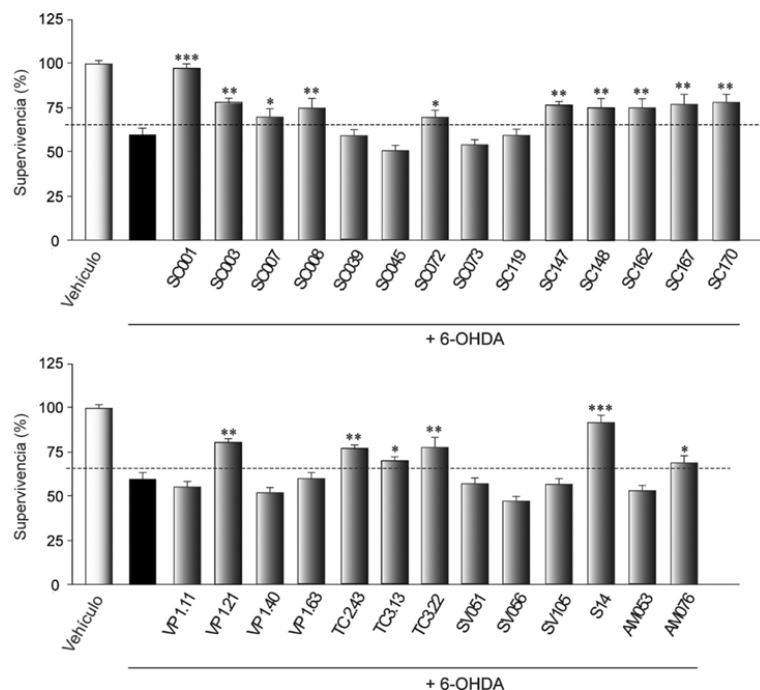


Figura 24. Cribado fenotípico de nuestra quimioteca interna de compuestos. Gráfica obtenida para 27 compuestos diferentes, entre un conjunto de 450 moléculas evaluadas.

Cabe destacar que uno de los compuestos utilizados en el ensayo fue el derivado **S14**, del que ya se conocía su potencial para aumentar la supervivencia en este modelo celular, y empleado por ello como compuesto de referencia. Un resultado interesante de este cribado fenotípico fue la identificación de la molécula **SC001**, que resultó ser un inhibidor de la enzima GSK-3 β , y que permitió la validación de esta enzima como diana terapéutica para el tratamiento de esta patología¹²¹. Otro compuesto, el derivado de diarilsulfuro **SC072**, resultó ser un inhibidor de PDE7A, bastante selectivo frente a otras PDEs (**tabla 4**), motivo por el cual se decidió elegir esta molécula como prototipo para continuar su desarrollo.

Tabla 4. Resultados de inhibición de **SC072** frente a PDE7A, PDE3A, PDE4B y PDE4D.

| | PDE7A | PDE3A | PDE4D | PDE4B |
|--------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| SC072 | Cl ₅₀ =2.1 μ M | 10 \pm 3% @10 μ M | 10 \pm 2% @10 μ M | 11 \pm 7% @10 μ M |

A continuación, se seleccionaron, de entre todos los compuestos de nuestra quimioteca, aquellos pertenecientes a la misma familia química que **SC072** y se evaluaron en PDE7A, observándose que prácticamente todos ellos inhibían la enzima en el rango micromolar, tal y como lo hacía el cabeza de serie identificado, si bien ninguno era más potente que éste (**figura 25**).

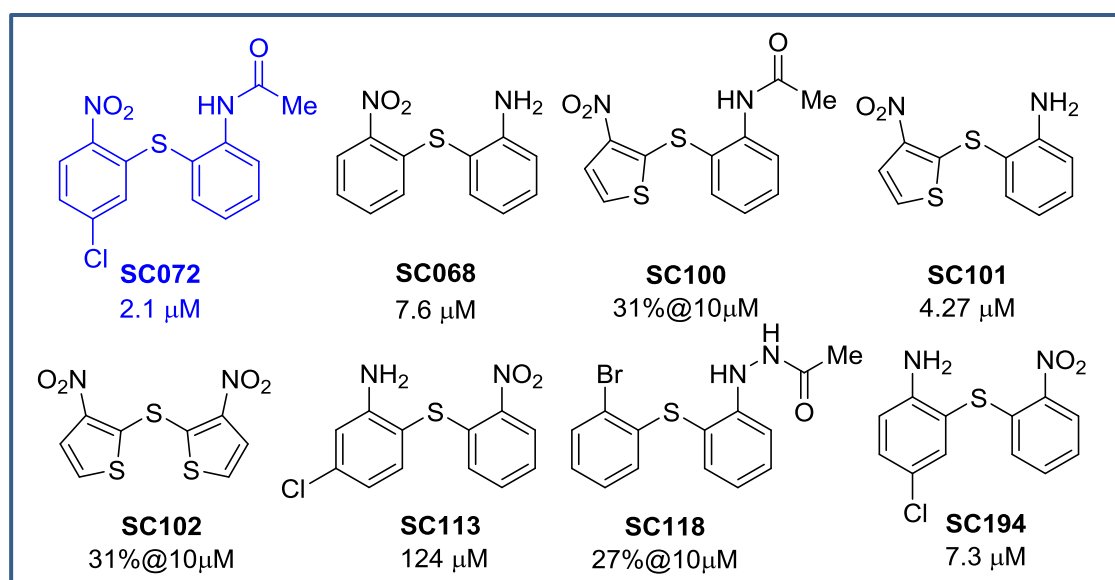


Figura 25. Conjunto de moléculas seleccionadas de nuestra quimioteca interna de compuestos, pertenecientes a la misma familia que **SC072**, y su evaluación enzimática en PDE7.

¹²¹ Morales-García, J.A.; Susín, C.; Alonso-Gil, S.; Pérez, D.I.; Palomo, V.; Pérez, C.; Conde, S.; Santos, A.; Gil, C.; Martínez, A.; Pérez-Castillo, A. "Glycogen synthase kinase-3 inhibitors as potent therapeutic agents for the treatment of Parkinson disease" *ACS Chem. Neurosci.* **2013**, *4*, 350-360.

1.3.2. Optimización del prototipo identificado: desarrollo de una nueva familia de inhibidores de PDE7

Puesto que la *N*-[2-(5-cloro-2-nitrofenil)io]fenil]acetamida (**SC072**) identificada como cabeza de serie presentaba una estructura novedosa respecto a los inhibidores de PDE7 descritos hasta el momento, decidimos llevar a cabo un programa de optimización de su estructura química mediante diferentes modificaciones con el fin de desarrollar una familia de análogos del mismo. Se estudió la influencia tanto de los diferentes sustituyentes en los anillos de fenilo como de la naturaleza del conector, sustituyendo el átomo de azufre por el de oxígeno, e introduciendo un átomo de carbono adicional para aumentar su longitud. Además, los anillos de fenilo fueron sustituidos por diferentes heterociclos que contenían nitrógeno o azufre tales como piridina, tiofeno y pirimidina. Por último, se llevó a cabo la reducción del grupo nitro o la acetilación del grupo amino del anillo de fenilo en algunos de los compuestos (**figura 26**).

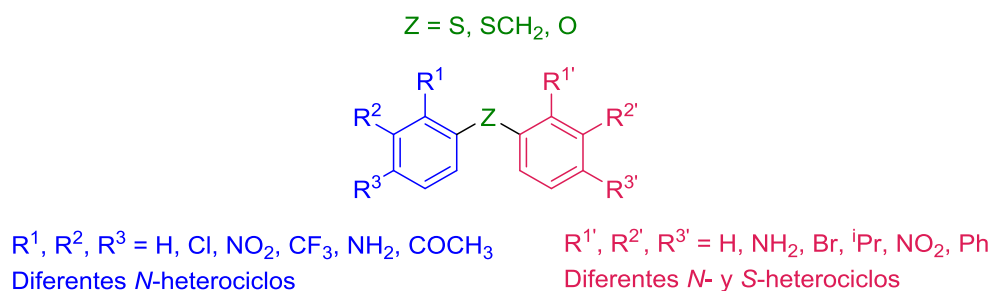


Figura 26. Modificaciones propuestas para el desarrollo de análogos del prototipo **SC072**.

En general, los compuestos fueron sintetizados mediante sustitución nucleófila aromática (S_NAr) de los haluros de arilo correspondientes, empleando como nucleófilos los tiol o alcoxi derivados. Dado que esta reacción sucede *vía* un mecanismo de adición-eliminación, la presencia de un grupo fuertemente atractor de electrones, como el grupo nitro o el trifluorometilo, en las posiciones orto y/o para respecto al grupo saliente en el haluro de arilo correspondiente favorece, por un lado, el ataque nucleófilo ya que el anillo aromático es menos rico en electrones, y por otro, la estabilización por resonancia de la carga negativa del anión ciclohexadienilo intermedio (**figura 27**).

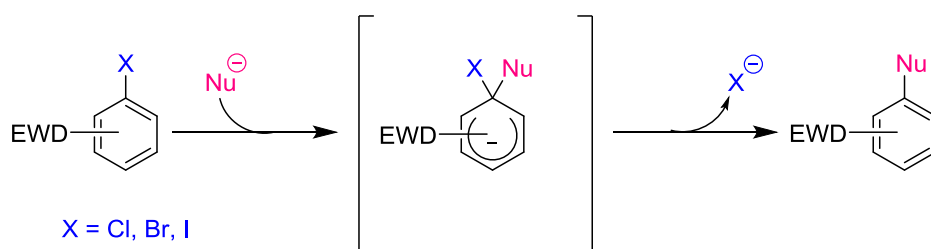
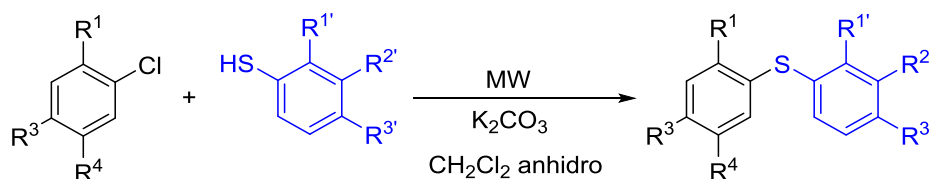


Figura 27. Mecanismo de S_NAr vía adición-eliminación.

Inicialmente, la síntesis de estos compuestos se llevó a cabo empleando carbonato potásico como base y diclorometano como disolvente, tal y como había sido previamente descrito¹²², introduciendo como novedad el empleo de la radiación microondas en sustitución de la calefacción convencional, lo que permitió reducir de manera sustancial las 21 horas necesarias para que la reacción se completase en las condiciones clásicas descritas. Así, se sintetizaron los derivados **32-43**, con tiempos de reacción que oscilaban entre los 45 y los 90 minutos, y temperaturas entre los 80 y los 100 °C, con unos rendimientos entre aceptables y moderados (**esquema 3**).



| Comp. | R ¹ | R ³ | R ⁴ | R ^{1'} | R ^{2'} | R ^{3'} | T (°C) | t (min) | Rto. (%) |
|-----------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|---------|----------|
| 32 | NO ₂ | Cl | Cl | NH ₂ | H | H | 80 | 90 | 52 |
| 33 | CF ₃ | NO ₂ | H | NH ₂ | H | H | 80 | 90 | 65 |
| 34 | Cl | NO ₂ | H | NH ₂ | H | H | 80 | 90 | 40 |
| 35 | NO ₂ | F | H | NH ₂ | H | H | 80 | 90 | 51 |
| 36 | NO ₂ | H | Cl | NH ₂ | H | H | 80 | 90 | 32 |
| 37 | CF ₃ | NO ₂ | H | H | H | NH ₂ | 100 | 45 | 53 |
| 38 | Cl | NO ₂ | H | H | H | NH ₂ | 100 | 45 | 45 |
| 39 | NO ₂ | H | Cl | H | H | NH ₂ | 100 | 45 | 77 |
| 40 | H | NO ₂ | Cl | H | H | NH ₂ | 100 | 45 | 61 |
| 41 | NO ₂ | H | Cl | Br | H | H | 80 | 90 | 36 |
| 42 | Cl | NO ₂ | H | Br | H | H | 80 | 90 | 40 |
| 43 | NO ₂ | H | Cl | H | H | Br | 80 | 90 | 32 |

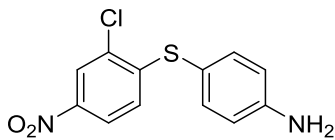
Esquema 3. Síntesis de los derivados de diarilsulfuro **32-43**.

¹²² Fried, K. W.; Schneider, C. M.; Schramm, K. W.; Datta, A.; Chahbane, N.; Corsten, C.; Powell, D. R.; Lenoir, D.; Kettrup, A.; Terranova, P.; Georg, G. I.; Rozman, K. K. "From dioxin to drug lead--the development of 2,3,7,8-tetrachlorophenothiazine", *ChemMedChem* **2007**, 2, 890-897.

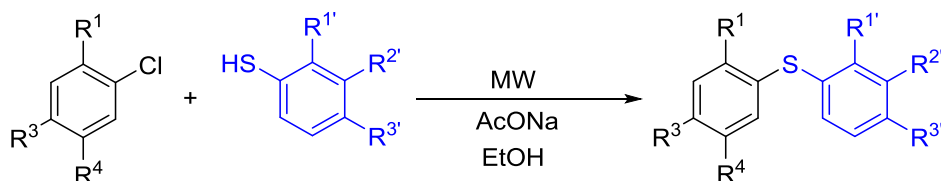
Sin embargo, debido a la frecuente dimerización del ariltiol, especialmente cuando éste presentaba un grupo activante en posición 4 respecto al azufre, hecho que dificultaba la posterior purificación del producto final, las condiciones de reacción anteriores fueron sustituidas por el empleo de etanol como disolvente y de acetato de sodio como base¹²³.

Así, volvió a llevarse a cabo la síntesis de uno de estos derivados, el compuesto **38**, empleando ahora estas nuevas condiciones de reacción, de manera que ya no se observaba el producto de dimerización en el crudo de reacción (**tabla 5**).

Tabla 5. Comparación de las metodologías A y B en la síntesis del compuesto **38**.

| Compuesto 38 | Condiciones | T (°C) | t (min) | Rto. (%) |
|---|--|--------|---------|----------|
|  | K ₂ CO ₃ , CH ₂ Cl ₂ | 100 | 45 | 45 |
| | AcONa, EtOH | 85 | 90 | 50 |

Por ello, se emplearon estas nuevas condiciones para llevar a cabo la síntesis de los derivados **44-55**, los cuales se muestran en el **esquema 4**.

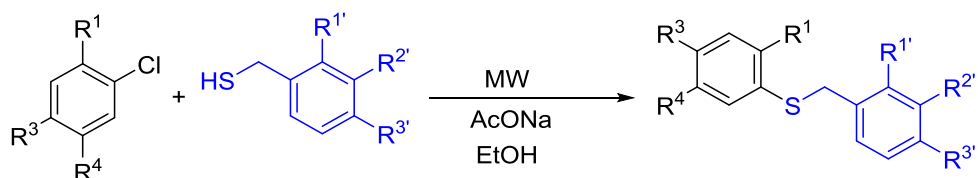


| Comp. | R ¹ | R ³ | R ⁴ | R ^{1'} | R ^{2'} | R ^{3'} | T (°C) | t (min) | Rto. (%) |
|-----------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|---------|----------|
| 44 | NO ₂ | Cl | H | NH ₂ | H | H | 85 | 120 | 60 |
| 45 | NO ₂ | Cl | H | H | NH ₂ | H | 85 | 120 | 32 |
| 46 | Cl | NO ₂ | H | H | NH ₂ | H | 85 | 120 | 77 |
| 47 | NO ₂ | F | H | H | H | NH ₂ | 85 | 120 | 54 |
| 48 | NO ₂ | Cl | H | H | H | NH ₂ | 85 | 90 | 45 |
| 49 | NO ₂ | Cl | Cl | Br | H | H | 85 | 90 | 17 |
| 50 | NO ₂ | Cl | H | Br | H | H | 85 | 90 | 70 |
| 51 | Cl | NO ₂ | H | H | H | Br | 85 | 90 | 57 |
| 52 | NO ₂ | Cl | H | H | H | Br | 85 | 90 | 85 |
| 53 | Cl | NO ₂ | H | ⁱ Pr | H | H | 85 | 90 | 48 |
| 54 | Cl | NO ₂ | H | H | H | ⁱ Pr | 85 | 90 | 30 |
| 55 | NO ₂ | Cl | H | H | H | ⁱ Pr | 85 | 90 | 60 |

Esquema 4. Síntesis de los derivados de diarilsulfuro **44-55**.

¹²³ Rathore, B.S.; Gupta, V.; Gupta, R.; Kumar, M. "Synthesis of 7-chloro-9-trifluoromethyl-7-fluorophenothiazines" *Heteroatom. Chem.* **2007**, 18, 81-86.

Estas mismas condiciones de reacción fueron empleadas para sintetizar los derivados **56** y **57**, en los cuales el tiol que actuaba como nucleófilo no era aromático sino bencílico (**esquema 5**).



| Comp. | R ¹ | R ³ | R ⁴ | R ^{1'} | R ^{2'} | R ^{3'} | T (°C) | t (min) | Rto. (%) |
|-----------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|---------|----------|
| 56 | Cl | NO ₂ | H | Br | H | H | 85 | 90 | 32 |
| 57 | NO ₂ | Cl | H | Br | H | H | 85 | 90 | 45 |

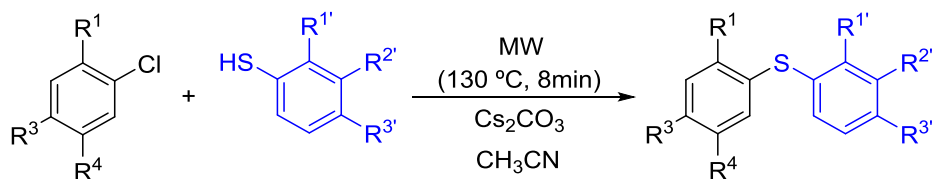
Esquema 5. Síntesis de los derivados de diarilsulfuro **56** y **57**.

No obstante, si bien se evitó la dimerización del tiol empleando estas nuevas condiciones de reacción, se pensó que el tiempo de reacción podría ser aún menor aprovechando las ventajas del calentamiento bajo irradiación de microondas. Así, se decidió probar la reacción con un disolvente polar, pero que tuviese un mayor punto de ebullición que el etanol, lo cual permitiría un aumento de la temperatura de reacción y, en consecuencia, podría disminuirse el tiempo de calentamiento. Con este fin, se llevó a cabo la síntesis del compuesto **48** empleando acetonitrilo como disolvente y carbonato de cesio como base. De esta manera, el tiempo se redujo notablemente, puesto que era suficiente calentar bajo irradiación microondas durante 8 minutos a 130 °C para obtener el producto deseado con un buen rendimiento (**tabla 6**).

Tabla 6. Comparación de las metodologías B y C en la síntesis del compuesto **48**.

| Compuesto 48 | Condiciones | T (°C) | t (min) | Rto. (%) |
|---------------------|--|--------|---------|----------|
| | AcONa, EtOH | 90 | 85 | 45 |
| | Cs ₂ CO ₃ , CH ₃ CN | 130 | 8 | 58 |

Esta metodología se empleó para llevar a cabo la síntesis de los derivados **58-61** (**esquema 6**).



| Comp. | R ¹ | R ³ | R ⁴ | R ^{1'} | R ^{2'} | R ^{3'} | Rto. (%) |
|-----------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------|
| 58 | NO ₂ | Cl | H | H | H | NO ₂ | 50 |
| 59 | Cl | NO ₂ | H | H | H | NO ₂ | 78 |
| 60 | NO ₂ | Cl | H | H | H | H | 66 |
| 61 | Cl | NO ₂ | H | H | H | H | 50 |

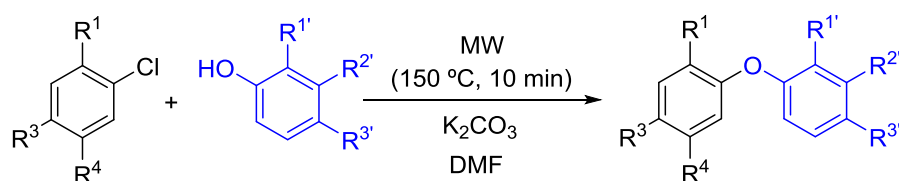
Esquema 6. Síntesis de los derivados de diarilsulfuro **58-61**.

Hasta aquí, todos los derivados sintetizados mantenían la estructura de difenilsulfuro, variando únicamente la sustitución en los anillos de fenilo de la molécula. En la parte del nucleófilo, se habían empleado tioles con sustituyentes activantes, tales como el grupo amino, en las diferentes posiciones R^{1'}, R^{2'} y R^{3'}, o grupos atractores de electrones como el bromo o el nitro, incluso el grupo isopropilo como ejemplo de resto alquílico. Respecto al anillo aromático que formaba inicialmente parte del electrófilo empleado en la reacción, se introdujeron grupos atractores de electrones tales como nitro, trifluorometilo o halógenos como flúor o cloro. Cabe destacar en este punto que, dado el mecanismo por el que transcurre la reacción de S_NAr, cuando el electrófilo presentaba más de un sustituyente halógeno en su estructura, el ataque nucleófilo se daba en todos los casos de manera regioselectiva en las posiciones orto o para respecto a los grupos atractores de electrones (NO₂, CF₃). Cuando el halógeno estaba presente tanto en la posición 2 como en la 4, se obtenían ambos productos de reacción, si bien en la mayoría de los casos el producto de sustitución en posición orto era el mayoritario frente al otro.

Tras la variación de los diferentes sustituyentes en los anillos de fenilo de la estructura de diarilsulfuro, se procedió a modificar la naturaleza del conector sustituyendo el átomo de azufre por el de oxígeno. En este caso, era el derivado de fenol, que se transformaba en alcóxido en medio básico, el que actuaba como nucleófilo para llevar a cabo la reacción de sustitución, empleando los halogenuros de arilo como electrófilos al igual que en las reacciones anteriores. En este caso se empleó DMF como disolvente y carbonato de potasio como base¹²⁴, sustituyendo una vez más la calefacción convencional empleada en dicho procedimiento por el calentamiento bajo irradiación microondas, lo que permitió llevar a cabo la reacción en tan solo 10 minutos a una temperatura de 150 °C, tras los

¹²⁴ Pilyugin, V.S.; Mikhailyuk, A.N.; Kiseleva, G.V.; Kuznetsova, S.L.; Chikisheva, G.E.; Kosareva, V.M. "Synthesis of 3,4,4'- and 2',3,4-triaminodiphenyl ethers" *Russ. J. Gen. Chem.* **2003**, 73, 1170-1175.

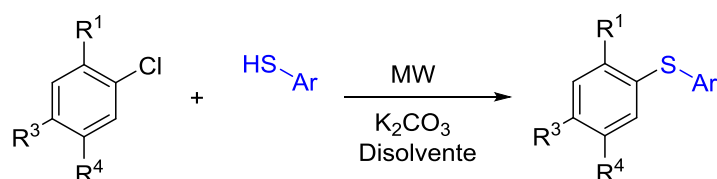
cuales no se observaba la presencia del fenol de partida en la mezcla de reacción. Siguiendo esta metodología se sintetizaron los derivados de diariléter **62-65** (esquema 7).



| Comp. | R ¹ | R ³ | R ⁴ | R ^{1'} | R ^{2'} | R ^{3'} | Rto. (%) |
|-----------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------|
| 62 | NO ₂ | Cl | H | H | H | NH ₂ | 40 |
| 63 | Cl | NO ₂ | H | H | H | NH ₂ | 54 |
| 64 | NO ₂ | Cl | H | H | H | 4-NHAc | 72 |
| 65 | Cl | NO ₂ | H | H | H | 4-NHAc | 78 |

Esquema 7. Síntesis de los derivados de diariléter **62-65**.

A continuación, manteniendo el azufre como conector, se procedió a la sustitución del anillo procedente del nucleófilo por otros heterociclos, obteniéndose los derivados **66-74** (esquema 8).



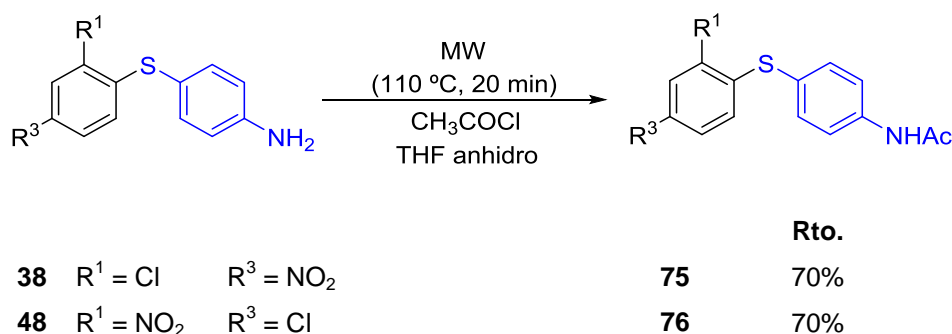
| Comp. | R ¹ | R ³ | R ⁴ | Ar | Disolv. | T (°C) | t (min) | Rto. (%) |
|-----------|-----------------|-------------------|----------------|----------|---------|--------|---------|----------|
| 66 | NO ₂ | Cl | H | 2-tienil | THF | 40 | 30 | 92 |
| 67 | Cl | NO ₂ | H | 2-tienil | THF | 40 | 30 | 80 |
| 68 | NO ₂ | H | Cl | 2-py | DMF | 150 | 10 | 53 |
| 69 | NO ₂ | Cl | H | 2-py | DMF | 150 | 10 | 92 |
| 70 | Cl | NO ₂ | H | 2-py | DMF | 150 | 10 | 76 |
| 71 | NO ₂ | H | Cl | 4-py | DMF | 150 | 10 | 45 |
| 72 | NO ₂ | Cl | H | 4-py | DMF | 150 | 10 | 88 |
| 73 | Cl | NO ₂ | H | 4-py | DMF | 150 | 10 | 52 |
| 74 | NO ₂ | COCH ₃ | H | 4-py | DMF | 150 | 10 | 40 |

Esquema 8. Síntesis de los derivados de diarilsulfuro **66-74**.

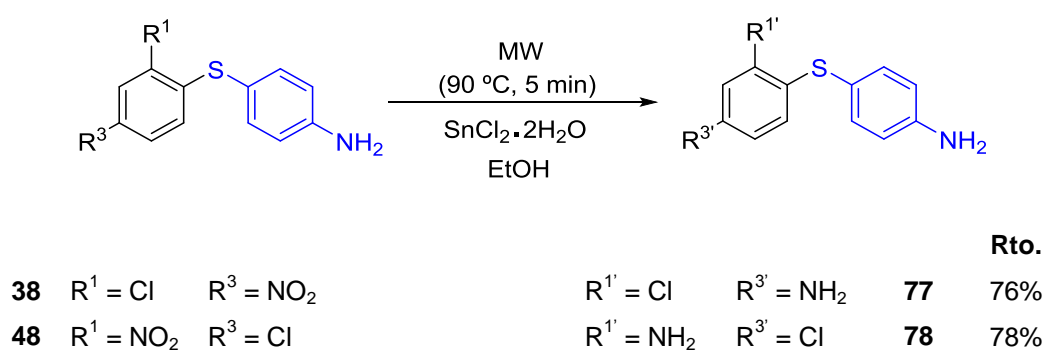
En este caso, se emplearon como productos de partida los tiol derivados de 2- y 4-piridina, y el de 2-tiofeno, y como electrófilos se siguieron empleando los mismos haluros de arilo que en los casos anteriores. Las reacciones se llevaron a cabo en disolventes

polares con un elevado punto de ebullición, tales como THF y DMF, empleando como base el carbonato de potasio. Cabe destacar que las reacciones de obtención de los derivados en los que el 2-tieniltiol era el nucleófilo se llevaron a cabo a una temperatura relativamente baja, puesto que un aumento de la temperatura conducía a la formación del producto de disustitución sin presencia del monosustituido. Este descenso de la temperatura permitió obtener de manera mayoritaria el producto de monosustitución.

Además, dado que el prototipo **SC072** presentaba un grupo amido como sustituyente de uno de los anillos, se seleccionaron los derivados **38** y **48**, que presentaban un grupo amino en la posición 4 del anillo respecto al azufre, y se llevó a cabo la reacción de *N*-acetilación en ambos casos, empleando cloruro de acetilo en tetrahidrofurano anhidro (derivados **75** y **76**, **esquema 9**). Por otro lado, empleando también los compuestos **38** y **48** como productos de partida, se procedió a la reducción del grupo nitro presente en el otro anillo de fenilo, empleando el cloruro de estaño (II) como agente reductor¹²⁵ (derivados **77** y **78**, **esquema 10**).



Esquema 9. Síntesis de los derivados de diarilsulfuro **75** y **76**.

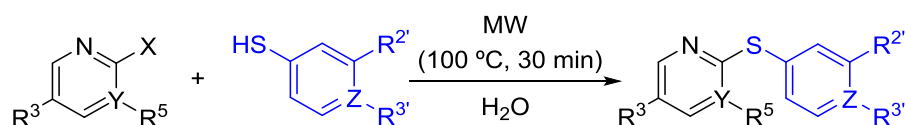


Esquema 10. Síntesis de los derivados de diarilsulfuro **77** y **78**.

¹²⁵ Wang, Y.; Wu, Ch. "Molecular probes for imaging of myelin" **2010**, WO2010/039815A1.

Finalmente, con el fin de seguir aumentando la diversidad estructural, se emplearon otros heterociclos, diferentes de los empleados anteriormente, teniendo en los productos finales heterociclos que contenían uno o más átomos de nitrógeno, tanto en la parte correspondiente al nucleófilo como en la correspondiente al electrófilo.

En este caso, cuando se empleaban derivados de 2-halopiridina como electrófilos, la síntesis se podía llevar a cabo empleando agua como disolvente de reacción y sin necesidad de ninguna base¹²⁶, sustituyendo la calefacción convencional por el calentamiento bajo irradiación microondas, lo que permitía que la reacción transcurriese calentando a 100 °C durante solo 30 minutos (derivados **79-83**, **esquema 11**).

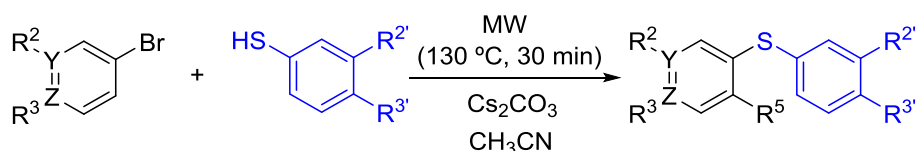


| Comp. | R ³ | R ⁵ | Y | X | R ^{2'} | R ^{3'} | Z | Rto. (%) |
|-----------|----------------|-----------------|---|----|-----------------|-----------------|---|----------|
| 79 | Me | NO ₂ | C | Cl | H | - | N | 76 |
| 80 | H | - | N | Cl | H | - | N | 30 |
| 81 | Me | NO ₂ | C | Cl | H | Ph | C | 55 |
| 82 | H | H | C | Br | H | Ph | C | 70 |
| 83 | Me | NO ₂ | C | Cl | NH ₂ | H | C | 50 |

Esquema 11. Síntesis de los derivados de diarilsulfuro **79-83**.

Cuando el nitrógeno piridínico no se encontraba en posición 2 respecto al grupo saliente, no era posible obtener el producto empleando las condiciones de reacción anteriores, por lo que en estos casos las reacciones se llevaron a cabo utilizando las condiciones que empleaban carbonato de cesio como base y acetonitrilo como disolvente optimizadas anteriormente, con las que se obtuvieron los derivados de diarilsulfuro **58-61**. Cabe destacar que debido a la menor reactividad de los electrófilos aquí empleados, y dada la ausencia de grupos fuertemente electroattractores, era necesario un mayor tiempo (30 minutos frente a los 8 minutos empleados anteriormente) para que la reacción se completara (derivados **84-87**, **esquema 12**).

¹²⁶ Sreedhar, B.; Surendra, P.; Amarnath, M. "Catalyst-Free and base-free water-promoted S_NAr reaction of heteroaryl halides with thiols" *Synthesis* **2009**, 10, 1732-1738.



| Comp. | R ² | R ³ | Y | Z | R ^{2'} | R ^{3'} | Rto. (%) |
|-----------|----------------|----------------|---|---|-----------------|-----------------|----------|
| 84 | H | - | C | N | H | H | 63 |
| 85 | H | - | C | N | H | OMe | 53 |
| 86 | H | - | C | N | NH ₂ | H | 33 |
| 87 | - | H | N | C | H | OMe | 58 |

Esquema 12. Síntesis de los derivados de diarilsulfuro **84-87**.

La asignación estructural de todos los derivados de sulfuro sintetizados (**32-87**) fue establecida en base a los datos analíticos y espectroscópicos de resonancia magnética nuclear tanto de ¹H como de ¹³C, tal y como se recoge en la parte experimental.

1.3.3. Evaluación enzimática y estudio del modo de unión

Todos los compuestos sintetizados fueron evaluados frente a la enzima PDE7A1 empleando la enzima recombinante humana siguiendo la misma metodología que para la familia de las tioquinazolinas. Inicialmente, los compuestos se ensayaron a una concentración de 10 μM para calcular el porcentaje de inhibición (**tabla 7**). Cuando este porcentaje era mayor del 50%, se determinó la curva dosis-respuesta que permitió calcular la CI₅₀. El compuesto **BRL50481**, conocido inhibidor de PDE7, se empleó como control en el ensayo (**tabla 7**).

Cabe destacar, por ejemplo, que los compuestos que presentan un grupo amino en las posiciones R^{1'}, R^{2'} o R^{3'} respecto al azufre del sulfuro son, en general, activos, siendo entre todas ellas la posición 4 la preferida por la enzima (compuestos **37**, **38**, **39**, **40**, **47**, **48**). En cuanto al átomo de bromo, cuando éste se encuentra en la posición orto (R^{1'}) los compuestos son activos (**41**, **42**, **49**, **50**), mientras que en el caso de la sustitución en la posición para (R^{3'}) se pierde la actividad (**43**, **51**, **52**). Cuando los compuestos presentan un grupo isopropilo (**53**, **54**, **55**) o un grupo nitro como sustituyentes en R^{3'} (**58**, **59**), no se obtienen derivados activos en ningún caso. De este modo, podría concluirse de manera general que la presencia de grupos activantes en uno de los dos anillos aromáticos proporciona compuestos activos; mientras que los sustituyentes desactivantes, o voluminosos como el isopropilo, en la posición R^{3'} del anillo, hacen que ésta se pierda.

Tabla 7. Valores de inhibición enzimática frente a PDE7A de los derivados de sulfuro (**32-87**) junto con el compuesto de referencia **BRL50481**. Los porcentajes de inhibición fueron calculados inicialmente a una concentración de compuesto de 10 μ M.

| Compuesto | PDE7A %inh @10 μ M | PDE7A CI ₅₀ (μ M) | Compuesto | PDE7A %inh @10 μ M | PDE7A CI ₅₀ (μ M) |
|-----------------|---------------------------|--------------------------------------|-----------|---------------------------|--------------------------------------|
| BRL50481 | 99.2 \pm 2.1 | 0.09 \pm 0.02 | 59 | 1.5 \pm 2.0 | - |
| SC072 | 58 \pm 2 | 2.10 \pm 0.32 | 60 | 87.6 \pm 0.5 | 1.50 \pm 0.02 |
| 32 | 74.8 \pm 3.6 | 6.48 \pm 1.06 | 61 | 74.6 \pm 0.1 | 2.20 \pm 0.13 |
| 33 | 42.8 \pm 6.2 | - | 62 | 70.4 \pm 0.2 | 3.30 \pm 0.71 |
| 34 | 60.9 \pm 3.3 | 8.77 \pm 1.34 | 63 | 78.2 \pm 1.2 | 2.20 \pm 0.10 |
| 35 | 38.7 \pm 3.7 | - | 64 | 17.8 \pm 0.8 | - |
| 36 | 66.2 \pm 9.3 | 5.45 \pm 1.17 | 65 | 4.6 \pm 1.7 | - |
| 37 | 63.3 \pm 3.6 | 9.27 \pm 0.68 | 66 | 81.8 \pm 0.9 | 1.60 \pm 0.36 |
| 38 | 83.1 \pm 0.3 | 3.97 \pm 0.35 | 67 | 69.6 \pm 2.0 | 5.20 \pm 1.10 |
| 39 | 71.7 \pm 0.7 | 2.20 \pm 0.10 | 68 | 56.8 \pm 1.6 | 7.98 \pm 1.23 |
| 40 | 79.4 \pm 1.6 | 1.47 \pm 0.22 | 69 | 69.9 \pm 2.3 | 3.60 \pm 0.11 |
| 41 | 69.6 \pm 4.2 | 1.01 \pm 0.10 | 70 | 69.2 \pm 0.8 | 1.29 \pm 0.64 |
| 42 | 59.5 \pm 1.3 | 2.14 \pm 0.63 | 71 | 80.0 \pm 1.7 | 1.88 \pm 0.21 |
| 43 | 36.2 \pm 0.8 | - | 72 | 91.2 \pm 1.7 | 0.72 \pm 0.06 |
| 44 | 69.5 \pm 1.4 | 5.75 \pm 1.36 | 73 | 86.0 \pm 0.5 | 0.18 \pm 0.09 |
| 45 | 68.2 \pm 1.3 | 5.69 \pm 0.41 | 74 | 56.5 \pm 0.9 | 3.80 \pm 0.63 |
| 46 | 78.4 \pm 1.8 | 3.20 \pm 0.83 | 75 | 7.1 \pm 3.2 | - |
| 47 | 64.7 \pm 1.0 | 6.18 \pm 0.21 | 76 | 26.8 \pm 0.4 | - |
| 48 | 81.9 \pm 1.0 | 0.37 \pm 0.07 | 77 | 13.7 \pm 1.0 | - |
| 49 | 49.0 \pm 1.8 | 2.88 \pm 0.17 | 78 | 46.3 \pm 0.1 | 6.50 \pm 1.03 |
| 50 | 79.5 \pm 0.8 | 0.99 \pm 0.05 | 79 | 27.1 \pm 4.2 | - |
| 51 | 23.7 \pm 5.9 | - | 80 | 12.8 \pm 1.3 | - |
| 52 | 11.6 \pm 0.7 | - | 81 | 1.8 \pm 1.2 | - |
| 53 | 17.2 \pm 3.5 | - | 82 | 32.8 \pm 3.4 | - |
| 54 | 15.4 \pm 1.6 | - | 83 | 3.4 \pm 1.6 | - |
| 55 | 10.7 \pm 3.2 | - | 84 | 44.4 \pm 1.4 | - |
| 56 | 33.9 \pm 2.4 | - | 85 | 18.1 \pm 2.8 | - |
| 57 | 31.2 \pm 1.4 | - | 86 | 36.0 \pm 3.5 | - |
| 58 | 6.6 \pm 2.0 | - | 87 | 17.4 \pm 0.5 | - |

La introducción de un átomo de carbono más en el conector (compuestos **56** y **57**) conlleva también la pérdida de actividad. Por otro lado, si se comparan los derivados de sulfuro con grupo amino en posición R³ (**38** y **48**) con sus análogos tipo éter (**63** y **62**), la actividad es similar, al igual que cuando en ambos casos el grupo amino está acetilado (**76**, **75** en los sulfuros y **64**, **65** en los éteres) la actividad se pierde. Siguiendo con los derivados en los que uno de los anillos aromáticos es piridina o tiofeno (**66-74**), todos ellos son activos independientemente de la sustitución del otro anillo, pero cuando tenemos heterociclos en vez de anillos de benceno tanto en una parte como en otra de la molécula (**79-87**), la actividad se pierde en todos los casos.

A continuación, con el fin de realizar una caracterización más precisa de la inhibición enzimática de esta familia de compuestos, se seleccionaron dos de los derivados más activos (**48** y **73**) y se llevó a cabo un estudio cinético en la Universidad de Santiago de Compostela con el fin de determinar qué tipo de inhibición presentaban estos compuestos. La unión de un determinado compuesto a una enzima puede producirse en el centro activo o sitio de unión de la misma, teniendo en este caso lo que se conoce como inhibidor competitivo con el ligando endógeno de la misma (que en el caso de PDE7 sería el AMPc), o bien la unión puede darse en otra cavidad diferente, teniendo entonces un modulador alostérico de la enzima. En este ensayo se midió la inhibición de la enzima empleando diferentes concentraciones de los compuestos seleccionados, pero manteniendo un valor de fijo para la concentración de AMPc. Con los datos obtenidos, se realizó una representación de dobles recíprocos para cada uno de los compuestos **48** y **73**, en la que en el eje de abscisas aparece la inversa de la concentración de AMPc empleada ($1/[AMPc]$) y en el eje de ordenadas, la inversa de la velocidad de formación del complejo enzima-inhibidor (**figura 28**).

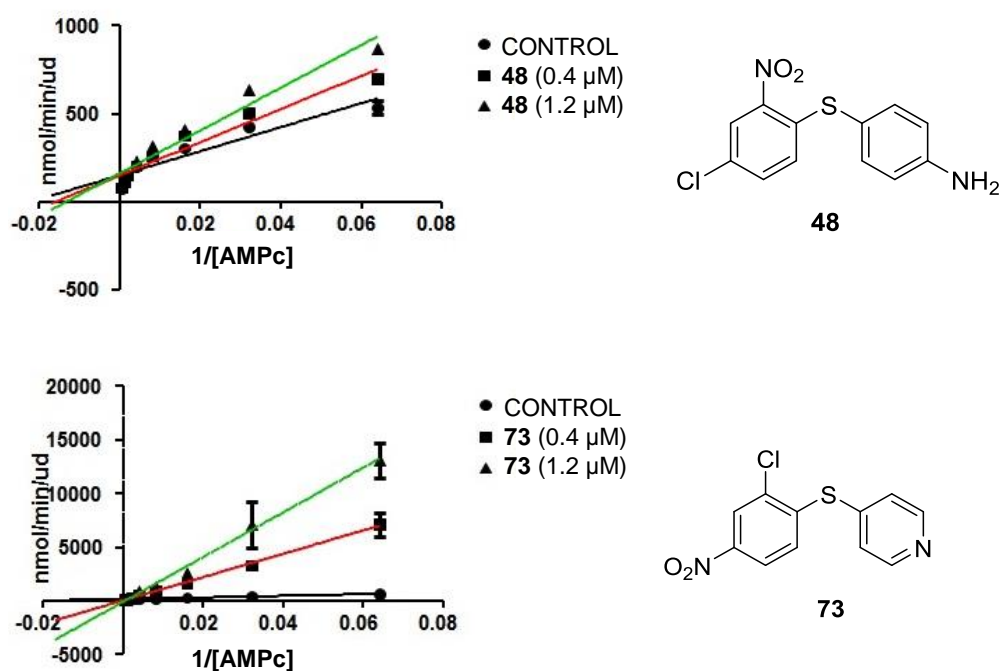


Figura 28. Gráfica de los estudios cinéticos realizados a diferentes concentraciones para los compuestos **48** y **73**.

Puede observarse que en ambas representaciones, las líneas correspondientes a las diferentes concentraciones de inhibidor cortan en el mismo punto del eje de ordenadas, lo que indica que la velocidad de formación del complejo enzima inhibidor permanece

constante independientemente de la concentración de inhibidor empleada en cada caso, lo cual demuestra que ambos compuestos en particular, y todos los compuestos de esta familia en general, son inhibidores competitivos de la enzima PDE7A.

Además de los estudios experimentales mostrados acerca del modo de unión de estos compuestos, se decidió examinar de manera teórica las interacciones más importantes de los mismos con los aminoácidos del centro activo de la enzima. Estos estudios fueron llevados a cabo empleando el programa Glide de Schrödinger, y siguiendo el procedimiento descrito en la parte experimental. Basándonos en los resultados de competición obtenidos, los estudios de *docking* se focalizaron en el sitio de unión del AMPc del dominio catalítico de la enzima (**figura 29**). Respecto al modo de unión del compuesto **48**, éste muestra una interacción π - π débil a través de su anillo aromático más pobre en electrones con la Phe416, aminoácido muy conservado a lo largo de toda la familia de PDEs, y además el grupo nitro de dicho anillo interacciona con la Gln413, otro aminoácido también muy conservado en todas las PDEs. El hecho de que sea el anillo más pobre en electrones el que establezca esa interacción podría deberse, por un lado, a la presencia de esta última interacción con la Gln413, pero sobre todo a que, según este modo de unión, el grupo amino del otro anillo de fenilo jugaría un papel muy importante en la actividad gracias a que sería capaz de establecer dos enlaces de hidrógeno simultáneamente con los grupos carbonilo de Thr321 y Asn362. La importancia de estas dos últimas interacciones de enlace de hidrógeno se confirmaría además debido a la pérdida de actividad de los derivados en los que ese grupo amino en posición 4 es sustituido por un átomo de Br (derivado **43**), por un grupo isopropilo (derivado **54**) o por un grupo nitro (derivado **58**). En lo que concierne al derivado **73**, el modo de unión propuesto de manera teórica podría explicar la importancia del nitrógeno de la 4-piridina, puesto que aparte de la interacción π - π que se establecería entre este anillo aromático y la Phe384, ese nitrógeno piridínico sería capaz de formar un enlace de hidrógeno con el grupo amino de Asn260. Por otro lado, cabría destacar que al comparar el modo de unión de los dos compuestos **48** y **73**, ambos conservarían las interacciones de uno de sus anillos aromáticos con la Phe416 y con la Gln413, pero la localización del otro anillo diferiría en ellos, probablemente debido a la capacidad del átomo de azufre para permitir el movimiento de este segundo anillo de manera que podrían establecerse las interacciones más favorables en cada caso, manteniendo al mismo tiempo las anteriormente mencionadas.

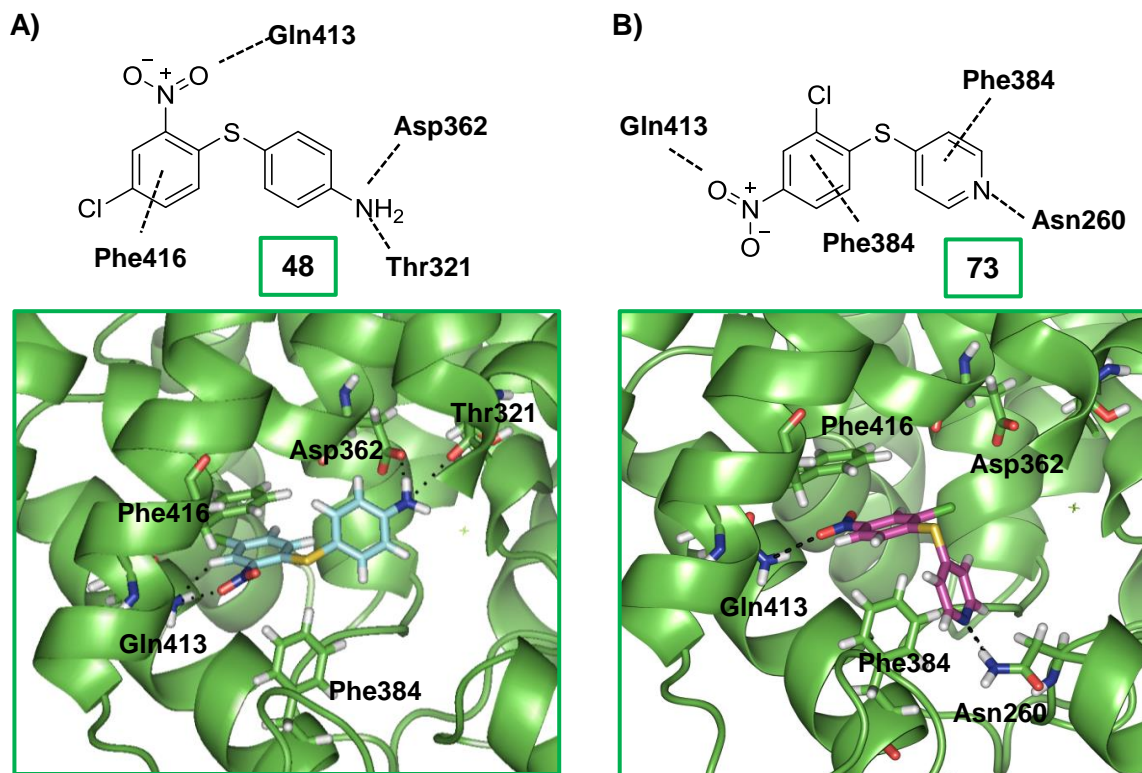


Figura 29. Modos de unión propuestos para los compuestos **48** (A) y **73** (B) con la enzima PDE7A (código PDB: 1ZKL). Las distancias se miden en angstroms.

1.3.4. Evaluación del perfil de selectividad de los inhibidores seleccionados

Para continuar con la caracterización enzimática y estudiar la seguridad de estos compuestos como potenciales candidatos a fármacos, se evaluó la inhibición de las enzimas PDE3 y PDE4 en un grupo de derivados de esta familia, todos ellos con una CI_{50} en PDE7A inferior a 1.5 μM (compuestos **40**, **41**, **48**, **50**, **60**, **70**, **72**, **73**). Además se llevó a cabo la evaluación en PDE7B, única isoenzima adicional de PDE7. Como ya se ha comentado en la introducción de este trabajo, la inhibición de PDE3 y PDE4 (concretamente la isoforma PDE4D) en humanos está relacionada con la aparición de efectos cardiotóxicos¹²⁷ y emetogénicos¹²⁸, respectivamente, y dada la influencia de estos efectos adversos en el fracaso de un gran número de inhibidores de PDEs para el tratamiento de diversas patologías en fases clínicas avanzadas, el estudio de la selectividad de los posibles candidatos a fármaco es de vital importancia desde las primeras fases del desarrollo, ya que el coste que supone su desarrollo aumenta de

¹²⁷ Movsesian, M.A.; Kukreja, R.C. "Phosphodiesterase inhibition in heart failure" *Handb. Exp. Pharmacol.* **2011**, 237-249.

¹²⁸ Robichaud, A.; Stamatiou, P.B.; Jin, S.L.; Lachance, N.; MacDonald, D.; Laliberte, F.; Liu, S.; Huang, Z.; Conti, M.; Chan, C. C. "Deletion of phosphodiesterase 4D in mice shortens alpha(2)-adrenoceptor-mediated anesthesia, a behavioral correlate of emesis" *J. Clin. Invest.* **2002**, 110, 1045-1052.

manera exponencial a medida que se va avanzando en el proceso de desarrollo de un fármaco. Los compuestos seleccionados fueron evaluados en las enzimas PDE3A, PDE4B y PDE4D, utilizando como controles en este ensayo el inhibidor de PDE7 **BRL50481** y el inhibidor de PDE4 **Rolipram**. Como resultado, ninguno de los derivados de sulfuro ensayados inicialmente a una concentración de 10 μM , era capaz de inhibir la enzima PDE3A, mientras que en el caso de PDE4, resultó que los compuestos **72** y **73** sí eran capaces de inhibir las dos isoformas de esta PDE en el rango micromolar, aunque dada la actividad submicromolar que presentaban estos dos derivados en PDE7A, la inhibición de PDE4 estaba un orden de magnitud por debajo de la misma. Con estos datos, se pudo concluir que los derivados más potentes obtenidos son en su mayoría inhibidores bastante selectivos de la enzima PDE7A, con excepción de los derivados **72** y **73**, que presentan una selectividad moderada en relación a PDE4, y que por lo tanto, estos compuestos estarían exentos de los efectos cardiotoxicos y emetogénicos asociados a la inhibición de PDE3 y PDE4 (**tabla 8**).

Tabla 8. Valores de evaluación enzimática en PDE7B, PDE3A, PDE4B y PDE4D de aquellos diarilsulfuros con CI_{50} (PDE7A) $\leq 1.5\mu\text{M}$. **BRL50481** y **Rolipram** se incluyen como compuestos de referencia. Todos los porcentajes de inhibición se calcularon a una concentración de compuesto de 10 μM .

| Compuesto | PDE7A CI_{50} (μM) | PDE7B %inh @10 μM | PDE7B CI_{50} (μM) | PDE3A %inh @10 μM | PDE4D %inh @10 μM | PDE4D CI_{50} (μM) | PDE4B %inh @10 μM | PDE4B CI_{50} (μM) |
|-----------------|--|------------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|--|------------------------------------|--|
| BRL50481 | 0.09 | | | 0.4 | | 1.28 | | 1.80 |
| Rolipram | - | | | 9.4 | | 0.08 | | 0.10 |
| 40 | 1.47 | 42.8 \pm 2.1 | - | 22.9 \pm 2.2 | 3.9 \pm 0.5 | - | 2.7 \pm 1.5 | - |
| 41 | 1.01 | 71.1 \pm 1.1 | 2.20 | 16.2 \pm 4.1 | 1.8 \pm 0.1 | - | 6.6 \pm 2.3 | - |
| 48 | 0.37 | 82.2 \pm 1.7 | 3.00 | 37.9 \pm 1.8 | 7.5 \pm 0.5 | - | 4.3 \pm 2.3 | - |
| 50 | 0.99 | 93.8 \pm 0.3 | 1.41 | 60.0 \pm 1.7 | 44.4 \pm 0.6 | - | 30.4 \pm 3.1 | - |
| 60 | 1.50 | 73.8 \pm 1.1 | 1.50 | 46.3 \pm 0.6 | 12.8 \pm 2.5 | - | 27.8 \pm 2.3 | - |
| 70 | 1.29 | 38.8 \pm 1.1 | - | 43.9 \pm 4.3 | 24.5 \pm 0.3 | - | 35.3 \pm 4.0 | - |
| 72 | 0.72 | 75.8 \pm 1.3 | 13.9 | 32.7 \pm 3.4 | 74.1 \pm 2.4 | 3.00 | 76.6 \pm 0.7 | 4.40 |
| 73 | 0.18 | 93.8 \pm 0.3 | 0.60 | 27.5 \pm 3.7 | 65.2 \pm 0.1 | 7.30 | 68.8 \pm 1.0 | 6.60 |

Además, con el fin de estudiar la selectividad de estos inhibidores de PDE7 frente a otras fosfodiesterasas, se evaluó la actividad enzimática de los derivados seleccionados **48** y **73** frente a diversas enzimas de esta familia, tales como PDE1A, PDE5, PDE8A, PDE9A y PDE10A. Los porcentajes de inhibición fueron determinados a una concentración de 10 μM (**tabla 9**), y nos permitieron afirmar que los compuestos **48** y **73** son inhibidores altamente selectivos de la enzima PDE7.

Tabla 9. Panel de PDEs de los compuestos **48** y **73** Los porcentajes de inhibición se midieron a una concentración de 10 μM en todos los casos.

| Compuesto | PDE1A %inh @10 μM | PDE5 %inh @10 μM | PDE8A %inh @10 μM | PDE9A %inh @10 μM | PDE10A %inh @10 μM |
|-----------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 48 | 36.0 \pm 1.0% | 28.0 \pm 3.0% | 1.2 \pm 0.8% | 7.0 \pm 1.0% | 57.5 \pm 3.4% |
| 73 | 39.0 \pm 4.0% | 21.0 \pm 1.0% | 2.4 \pm 1.1% | 1.0 \pm 1.0% | 29.4 \pm 5.6% |

1.3.5. Efecto de la inhibición de PDE7 en los niveles de AMPc

Con el fin de evaluar el potencial de los inhibidores de PDE7 derivados de sulfuro para incrementar los niveles de AMPc en un modelo celular, se decidió evaluar el efecto que estos compuestos producían en los niveles de CREB fosforilado, lo cual constituye una medida indirecta de los niveles de dicho nucleótido. Para llevar a cabo este ensayo, se empleó la línea celular SH-SY5Y y los dos derivados de sulfuro más activos en PDE7 **48** y **73**. Las células fueron tratadas con cada uno de los dos compuestos por separado y, a continuación, se cuantificaron los niveles de CREB en la muestra control (sin tratar) y en las muestras tratadas con cada uno de los inhibidores de PDE7 mediante *Western blot*. Este experimento fue realizado en colaboración con el grupo de la Profesora Ana Pérez Castillo (IIB-CSIC). Los resultados de este experimento muestran un claro aumento en la fosforilación de CREB cuando se tratan las células con los dos inhibidores de PDE7 **48** y **73** respecto a las células sin tratar, lo cual permite corroborar la capacidad de los mismos para incrementar los niveles de AMPc *via* inhibición de PDE7 (**figura 30**).

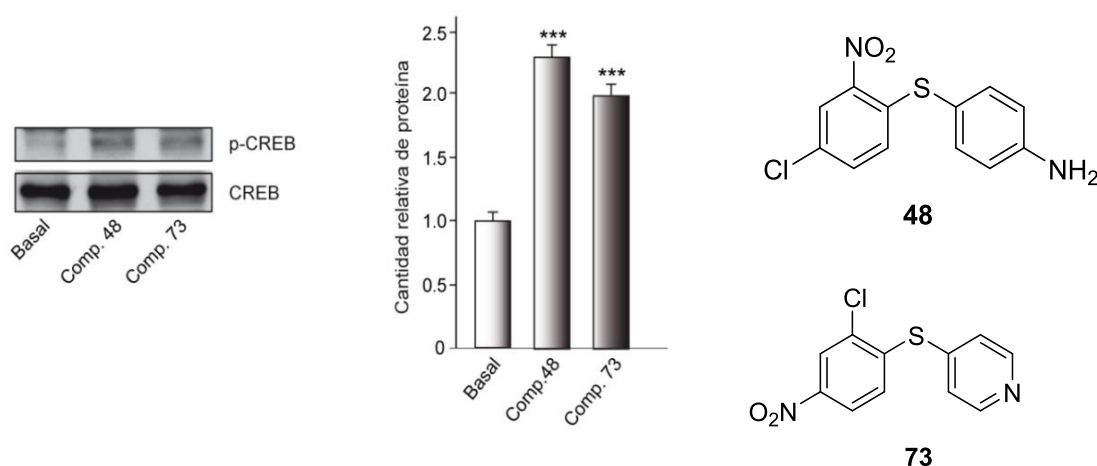


Figura 30. Efecto ejercido por los compuestos **48** y **73** en el estado de fosforilación de CREB. *** $p \leq 0.001$.

1.3.6. Predicción del paso de barrera hematoencefálica

Al igual que se hizo con los derivados de tioxoquinazolina, se evaluó el paso de barrera hematoencefálica de los derivados de diarilsulfuro más activos, obteniéndose la recta de correlación $y = 1,8979x - 1,667$ ($R^2 = 0,9506$) a partir de la representación de los valores de Pe experimentales frente a los valores teóricos descritos.

A continuación, siguiendo la metodología descrita¹¹⁵, se calculó como límite inferior a partir del cual los compuestos eran SNC+ el valor de permeabilidad $5.92 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, y en base a este valor, se pudo concluir que los compuestos evaluados **40, 48, 50, 70, 72 y 73** eran capaces de atravesar la barrera hematoencefálica mediante difusión pasiva (**tabla 10**), y por lo tanto, podrían ser considerados buenos candidatos para el tratamiento de enfermedades del SNC como inhibidores de PDE7.

Tabla 10. Datos obtenidos del ensayo PAMPA-BHE ($Pe \text{ } 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) para los derivados de diarilsulfuros seleccionados ($CI_{50} < 1.5 \mu\text{M}$).

| Compuesto | Pe experimental | Pe bibliografía | PAMPA-BHE |
|----------------|-------------------|-------------------|-----------|
| Atenolol | 0.7 ± 0.1 | 0.8 | |
| Cafeína | 1.5 ± 0.1 | 1.3 | |
| Desipramino | 14.2 ± 0.6 | 12 | |
| Enoxacino | 0.8 ± 0.1 | 0.9 | |
| Hidrocortisona | 2.0 ± 0.8 | 1.9 | |
| Ofloxacino | 1.5 ± 0.3 | 0.8 | |
| Piroxicam | 0.9 ± 0.1 | 2.5 | |
| Promazina | 15.1 ± 1.3 | 8.8 | |
| Testosterona | 34.6 ± 4.0 | 17 | |
| Verapamilo | 29.7 ± 1.5 | 16 | |
| 40 | 12.4 ± 1.1 | | SNC+ |
| 41 | 1.5 ± 0.2 | | SNC - |
| 48 | 11.2 ± 3.1 | | SNC + |
| 50 | 6.8 ± 2.0 | | SNC + |
| 70 | 11.3 ± 1.1 | | SNC + |
| 72 | 14.4 ± 2.1 | | SNC + |
| 73 | 12.5 ± 1.2 | | SNC + |

1.3.7. Evaluación de los nuevos derivados de diarilsulfuro en un modelo *in vitro* de la enfermedad de Parkinson

Con el fin de conocer el efecto de los derivados de la familia de los sulfuros en la supervivencia celular de la línea SH-SY5Y dañada con 6-OHDA, se evaluaron todos aquellos compuestos sintetizados que presentaron una CI_{50} en PDE7A menor de $1.5 \mu\text{M}$

(**40**, **41**, **48**, **50**, **60**, **70**, **72**, **73**). Tras el tratamiento de las células con 6-OHDA, y posteriormente con cada uno de los derivados seleccionados, se evaluó la viabilidad de las mismas mediante el ensayo con MTT descrito anteriormente. En el ensayo se incluyeron los derivados de la familia de los sulfuros seleccionados así como el inhibidor comercial de PDE7 **BRL50481** y la tioxoquinazolina **S14**, utilizados estos dos últimos como controles.

Los resultados de la **figura 31** muestran que, mientras que los compuestos **50** y **72** son capaces de aumentar, de manera moderada, la supervivencia celular, el derivado **48** lo hace con una eficiencia similar a la de los inhibidores controles **BRL50481** y **S14**.

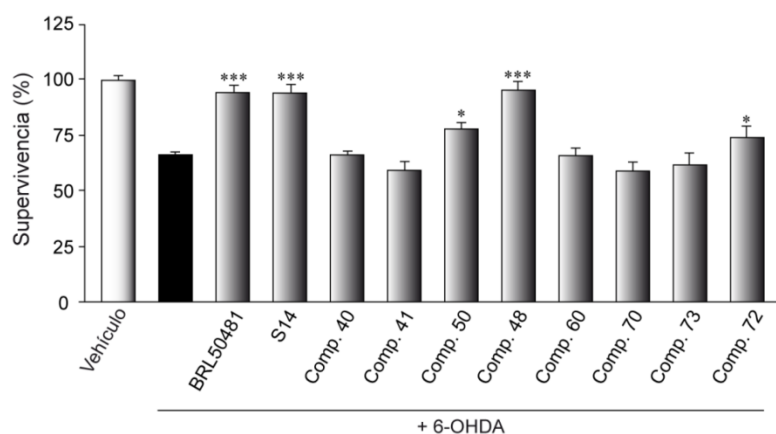


Figura 31. Medida de la supervivencia de la línea celular SH-SY5Y tras la exposición a 6-OHDA, en presencia o ausencia de inhibidores de PDE7A de la familia de los diarilsulfuros. *** $p \leq 0.001$, * $p \leq 0.05$.

1.3.8. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los nuevos derivados de diarilsulfuro

Por otro lado, dado el importante papel del AMPc en la inflamación, se estudió el potencial antiinflamatorio de algunos inhibidores de PDE7 de esta familia (**40**, **41**, **48**, **50**, **60**, **70**, **72**, **73**), empleando cultivos primarios de astrocitos y microglía. Estas células fueron tratadas con estos inhibidores y posteriormente dañadas con LPS, con el fin de medir la capacidad de los mismos para protegerlas frente al daño inflamatorio que este lipopolisacárido les causaba. Tal y como se recoge en la **figura 32**, la mayoría de los inhibidores de PDE7 estudiados son capaces de proteger significativamente frente a la inflamación ocasionada por el tratamiento con LPS.

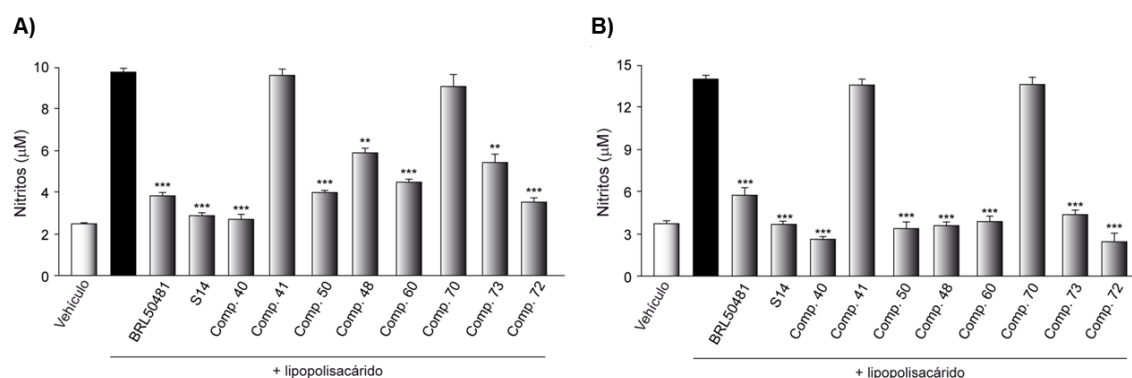


Figura 32. Medida de la producción de nitritos mediante la reacción de Griess en cultivos primarios de astrogliá **(A)** y microgliá **(B)**, tratado con LPS en presencia o ausencia de los inhibidores de PDE7 pertenecientes a la familia de los diarilsulfuros. *** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$.

1.3.9. Estudio del efecto emetogénico *in vivo* de los inhibidores de PDE7

Hasta el momento, la aparición de efectos adversos como émesis y náuseas encontrados durante el desarrollo clínico de los inhibidores de PDE4 había impedido su comercialización a pesar de su eficacia. Solo dos inhibidores de esta enzima, Roflumilast y Apremilast, han sido aprobados por las autoridades regulatorias pertinentes para el tratamiento de la EPOC y de la artritis psoriática, respectivamente, gracias a que presentaban una ventana terapéutica adecuada para disminuir en preclínica dichos efectos gastrointestinales.

El modelo más común para estudiar los efectos eméticos, pero también el más caro, es el empleo de hurones, puesto que a diferencia de los ratones y ratas, estos animales sí tienen un reflejo emético similar al humano. Sin embargo, recientemente se han desarrollado algunos modelos surrogados que permiten predecir los efectos emetogénicos de un posible candidato a fármaco en fases tempranas del desarrollo y con un coste mucho más reducido. En uno de ellos, se evalúa la capacidad de los inhibidores de PDE4 para revertir el efecto anestésico inducido por agonistas del receptor adrenérgico α_2 . La aparición de émesis en fases más avanzadas del desarrollo al administrar estos inhibidores está directamente relacionada con la reducción del tiempo de duración de la anestesia en los animales¹²⁸.

Así, decidimos estudiar los posibles efectos eméticos del derivado de sulfuro **48** empleando el modelo anterior. Los ensayos fueron llevados a cabo en colaboración con el grupo de la Profesora Olga Valverde en la Universidad Pompeu Fabra. Se emplearon como controles 3 compuestos diferentes: **(R)-Rolipram** (1 mg/kg), **Roflumilast** (1 mg/kg) y **BRL50481** (5 mg/kg). **Rolipram** y **Roflumilast** son dos inhibidores de PDE4, mientras que **BRL50481** es un inhibidor de PDE7. Las dosis de los compuestos fueron

seleccionadas mediante experimentos preliminares, y se tomó como fin de la duración de la anestesia el momento en el que los ratones, que se encontraban inicialmente en posición decúbito supino, pasan a posición decúbito prono de manera espontánea. Para inducir el efecto anestésico en los animales, se empleó una combinación de xilacina (10 mg/kg) y ketamina (100 mg/kg) que provocaba una pérdida de reflejos dentro de los 15 minutos siguientes a la inyección. Comparando los diferentes grupos de ratones, se vio que **Rolipram** y **Roflumilast** eran capaces de disminuir la duración de la anestesia, tal y como se muestra en la **figura 33**, mientras que **BRL50481**, empleado a una dosis 5 veces mayor que los compuestos anteriores, no ejercía ningún efecto sobre la misma. El compuesto **48**, perteneciente a la familia de los sulfuros aquí descrita, que fue evaluado a diferentes dosis (2.5, 5 y 10 mg/kg), tampoco modificaba la duración del efecto anestésico, confirmándose por tanto, la ausencia de efectos eméticos adversos relacionados con la familia de diarilsulfuros.

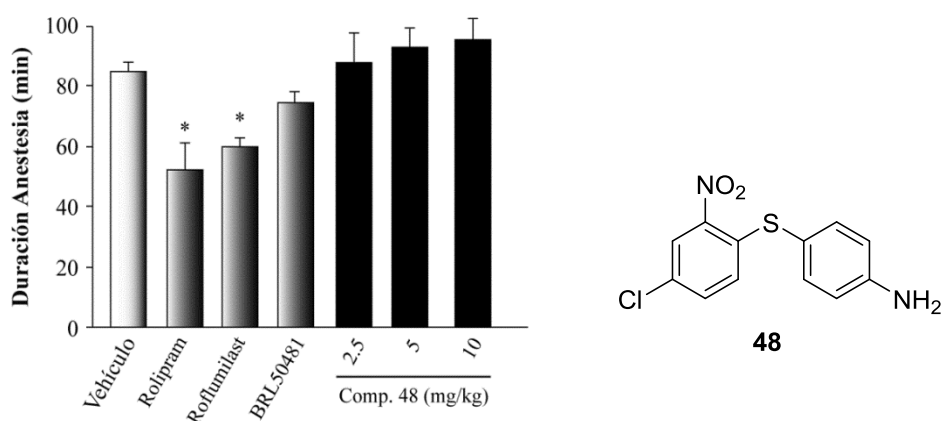


Figura 33. Efecto del compuesto **48** en la duración de la anestesia, evaluado a diferentes concentraciones. * $p < 0.05$.

Además, para extrapolar estas conclusiones a otros inhibidores de PDE7, se evaluaron en este mismo modelo otros tres inhibidores de PDE7 químicamente diversos, sintetizados previamente en nuestro grupo de investigación. Los compuestos evaluados fueron la 3-fenil-2,4-ditioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina (**TC3.6**, $Cl_{50} = 1.04 \mu M$), el 5-fenil-2-furoato de 3,4,5-trimetoxibencilo (**MR1.51**, $Cl_{50} = 5.17 \mu M$) y el hidrobromuro de 5-(2-hidroxietilimino)-2,3-difenil-2,5-dihidro-1,2,4-tiadiazol (**VP1.15**, $Cl_{50} = 1.11 \mu M$). Como era de esperar, ninguno de estos compuestos ejercía efecto alguno en la duración de la

anestesia en los animales (**figura 34**), confirmando la ausencia de efecto emetogénico asociado al empleo de inhibidores de PDE7 frente al efecto observado en los de PDE4¹²⁹.

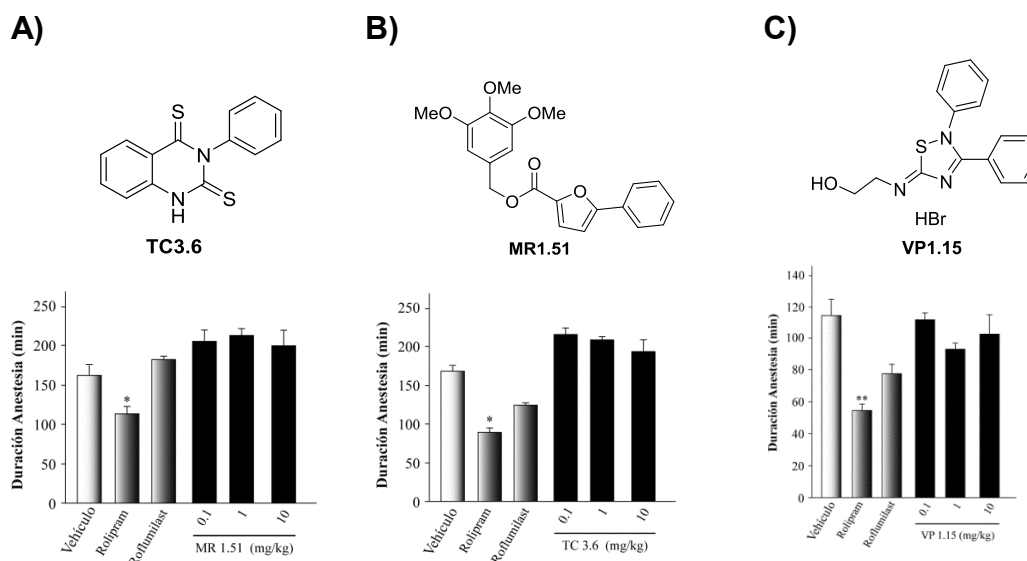


Figura 34. Efecto de tres inhibidores de PDE7 químicamente diversos en la duración de la anestesia. **(A)** Compuesto **TC3.6**, $F(5, 45) = 12.003$, $p < 0.01$. * $p < 0.05$. **(B)** Compuesto **MR1.51**, $F(5, 58) = 9.776$, $p < 0.001$. * $p < 0.05$. **(C)** Compuesto **VP1.15**, $F(5, 56) = 5.508$, $p < 0.01$. ** $p < 0.1$.

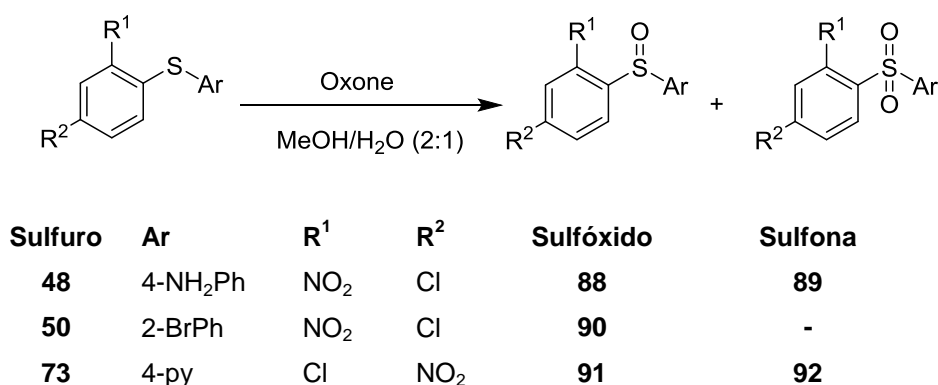
1.4. Oxidación química de los derivados de diarilsulfuro

Dada la naturaleza de los inhibidores de PDE7 de la familia de los diarilsulfuros, se decidió llevar a cabo la oxidación química de estos derivados con el fin de caracterizar y estudiar el comportamiento biológico de los diferentes productos de oxidación obtenidos. Entre todos los derivados sintetizados, se seleccionaron los compuestos **48** y **50**, los cuales presentaban anillos de arilo diferentemente sustituidos; y el derivado **73**, en el que uno de los anillos era un heterociclo, la 4-piridina. De este modo podríamos a su vez estudiar el diferente comportamiento frente a la oxidación en función de la sustitución de cada uno de los derivados de sulfuro empleados.

Existen descritas en la bibliografía numerosas metodologías para llevar a cabo la oxidación del azufre, muchas de ellas emplean peróxido de hidrógeno como agente oxidante y, en la mayoría de los casos, incluso catalizadores metálicos específicos. Otro

¹²⁹ García, A.M.; Brea, J.; Morales-García, J.A.; Perez, D.I.; González, A.; Alonso-Gil, S.; Gracia-Rubio, I.; Ros-Simó, C.; Conde, S.; Cadavid, M.I.; Loza, M.I.; Perez-Castillo, A.; Valverde, O.; Martinez, A.; Gil, C. "Modulation of cAMP specific PDE without emetogenic activity: new sulfide-like PDE7 inhibitors" *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 8590-8607.

de los agentes oxidantes empleados es el Oxone®, sal inorgánica de potasio, que presenta la siguiente composición $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$, y en la que el componente activo responsable de la oxidación es el peroxomonosulfato potásico, KHSO_5 . Este reactivo ha sido ampliamente utilizado para llevar a cabo la oxidación de diversos sustratos (aminas, alcoholes, sulfuros), y las ventajas que presenta frente a otros como el peróxido de hidrógeno son su mayor estabilidad y su alta eficiencia, lo que hace que no sea necesario el empleo de ningún catalizador adicional. Así, se decidió llevar a cabo las reacciones de oxidación en una mezcla metanol/agua 2:1 como disolvente, empleando Oxone® (0.8 equiv) como agente oxidante, agitando la mezcla de reacción durante 24 horas a temperatura ambiente¹³⁰, tal y como se encuentra recogido en la parte experimental. Tras este tiempo, los crudos de reacción fueron analizados por HPLC-MS, con el fin de identificar los diferentes productos (sulfóxido y/o sulfona) en función del grado de oxidación que estos presentasen, como paso previo a su aislamiento y caracterización (**esquema 13**).



Esquema 13. Reacción de oxidación de los derivados de diarilsulfuro **48**, **50** y **73**.

En el caso del compuesto **48**, se aislaron como productos de oxidación tanto el sulfóxido **88** como la correspondiente sulfona **89**. Sin embargo, en el caso del compuesto **50**, tras las 24 horas de reacción solo se detectó el pico correspondiente al sulfóxido (compuesto **90**) en el cromatograma, e independientemente de que se aumentase el tiempo de reacción, los equivalentes de agente oxidante o se calentase la mezcla de reacción a reflujo, no se detectó la presencia de la sulfona.

Por su parte, el derivado de 4-piridina **73**, se oxidó dando lugar al sulfóxido **91** y la sulfona **92** correspondientes. Además, dado que este compuesto presenta un nitrógeno piridínico en su estructura, y es conocido que este átomo es también susceptible de

¹³⁰ Yu, B.; Liu, A.; He, L.; Li, B.; Diao, Z.; Li, Y. "Catalyst-free approach for solvent-dependent selective oxidation of organic sulfides with oxone" *Green Chem.* **2012**, *14*, 957-962.

oxidación, se decidió llevar a cabo de nuevo la oxidación del derivado **73** con el fin obtener el producto correspondiente a la oxidación de dicho nitrógeno, empleando en este caso 1.6 equivalentes del agente oxidante (frente a los 0.8 equivalentes que se empleaban en todos los casos anteriores). Así, tras 24 horas de agitación a temperatura ambiente, se detectaba por HPLC-MS la formación de un producto cuya masa correspondía a la introducción de 3 átomos de oxígeno en la molécula de partida, que podría corresponderse con el derivado de sulfona y *N*-óxido, el cual fue aislado de la misma manera que los derivados anteriores (**figura 35**).

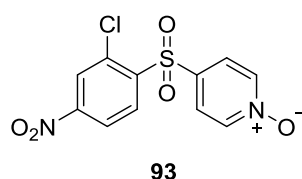


Figura 35. Derivado de sulfona y *N*-óxido obtenido mediante oxidación del sulfuro **73**.

La caracterización estructural de los productos de oxidación se llevó a cabo mediante resonancia magnética nuclear de ^1H y de ^{13}C , empleando tanto espectroscopía monodimensional como espectroscopía de correlación bidimensional homonuclear (COSY ^1H - ^1H) y heteronuclear (HSQC y HMBC ^1H - ^{13}C). Además, dada la similitud estructural entre los productos de partida y los obtenidos mediante oxidación, se utilizó la información del pico molecular obtenida mediante espectrometría de masas con el fin de corroborar el número de átomos de oxígeno presentes en las moléculas.

Para la asignación inequívoca de cada una de las señales de RMN, se deben considerar los efectos sobre los desplazamientos químicos relacionados con la densidad de carga y con la anisotropía magnética. La anisotropía magnética es un fenómeno que aparece en los protones próximos a dobles enlaces, como alquenos o carbonilos, y anillos aromáticos, de manera que el campo magnético inducido por las corrientes electrónicas de estos sistemas se suma al aplicado, dando lugar a un desapantallamiento de las señales de estos protones que presentan un desplazamiento químico a campos más bajos que los esperados (**figura 36**). Este efecto, ejercido de manera más notable por el grupo carbonilo, también se observa en los derivados de sulfóxido y sulfona¹³¹. Según esta definición, en el caso de ^1H -RMN se deben considerar los efectos ejercidos tanto por la densidad de carga como por la anisotropía, mientras que en el caso de ^{13}C -RMN el

¹³¹ Abraham, R.J.; Byrne, J.J.; Griffiths, L. " ^1H chemical shifts in NMR. Part 27: proton chemical shifts in sulfoxides and sulfones and the magnetic anisotropy, electric field and steric effects of the SO bond" *Magn. Res. Chem.* **2008**, *46*, 667-675.

efecto de anisotropía es poco importante, y lo que más influye en el desplazamiento químico de las señales es la densidad de carga presente en cada átomo de carbono de la molécula.

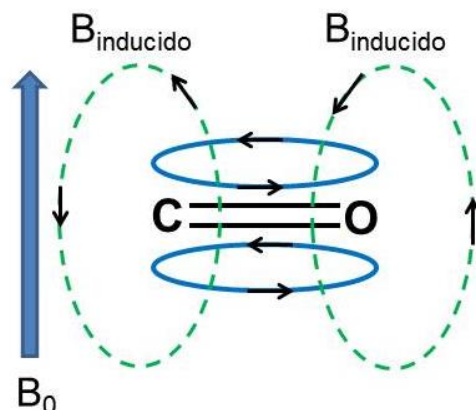


Figura 36. Representación de la anisotropía magnética en el grupo carbonilo.

En primer lugar, en el caso de los derivados de sulfóxido obtenidos **88**, **90** y **91**, se compararon los espectros de protón de cada uno de ellos con sus correspondientes sulfuros de partida **48**, **50** y **73**, observándose que los protones H-2, H-6 y H-12, especialmente éste último, se desplazan a campo más bajo en el correspondiente sulfóxido respecto al desplazamiento que presentan en el espectro de ^1H -RMN del sulfuro de partida (compuestos **73** y **91**, **figura 37**). El desapantallamiento de H-2, H-6 y H-12 está relacionado mayormente con el efecto anisotrópico del grupo sulfóxido. El hecho de que este efecto se observe de manera más notable en el protón H-12 que en los protones H-2 y H-6 puede residir en la disposición espacial que presentan estos compuestos en disolución. Para estudiarlo, se llevó a cabo la minimización utilizando el programa Spartan y el método Hartree-Fock, obteniéndose las conformaciones de mínima energía utilizando en todos los casos como medio de solvatación cloroformo, disolvente en el que se registran los espectros de RMN (**figura 38**). Los dos anillos aromáticos se encuentran orientados en diferentes planos, para minimizar el impedimento estérico, disponiéndose el anillo en el que se encuentra H-12 de tal manera que el enlace C12-H12 se orienta en la misma dirección que el enlace S=O, minimizándose también así la repulsión con el grupo presente en C-8 (NO_2 , Cl), y esto conduce a que el campo magnético resultante sea mayor sobre este protón H-12 que sobre ningún otro protón en la molécula.

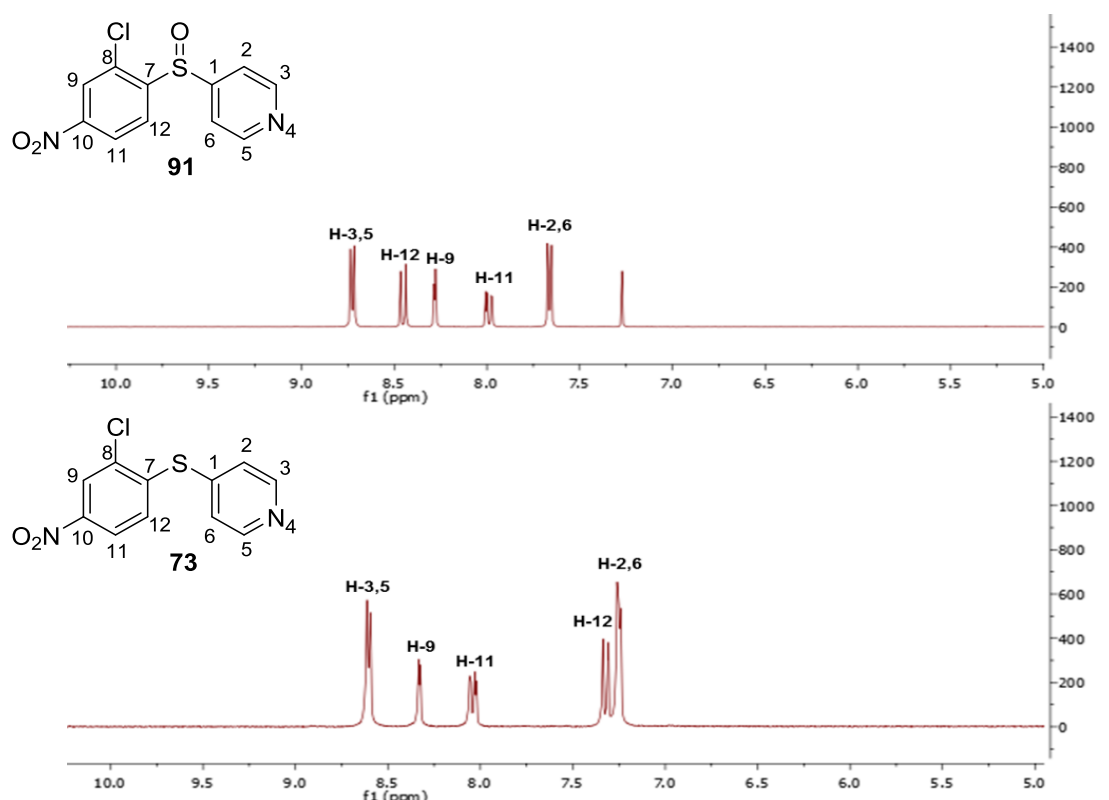


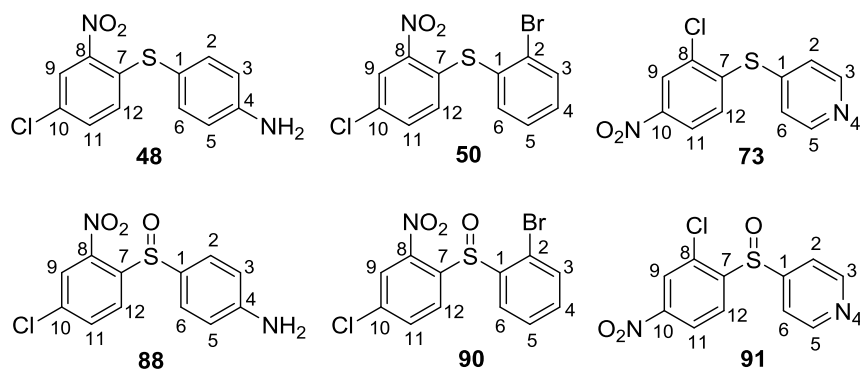
Figura 37. Comparación del espectro de ^1H -RMN de los compuestos **73** y **91**.



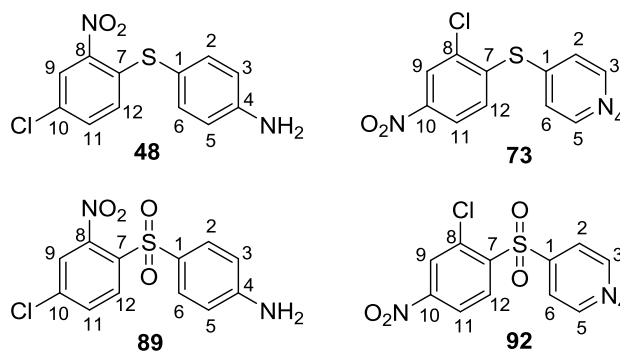
Figura 38. Conformaciones más estables de los sulfonamidos **88**, **90** y **91**.

Los desplazamientos químicos de ^1H -RMN de los tres derivados de sulfonamido obtenidos **88**, **90** y **91** se muestran en la **tabla 11**. En el caso del sulfonamido **90**, cabe destacar el apantallamiento que se produce en el protón H-6 dado el efecto electrónico del átomo de bromo presente en este derivado.

En cuanto a los derivados de sulfona **89** y **92**, obtenidos como productos de oxidación de los derivados **48** y **73**, respectivamente, se observó un desplazamiento de las señales de los protones H-2, H-6 y H-12 a campos más bajos, de la misma manera que ocurría en los sulfonamidos (**tabla 12**).

Tabla 11. Comparación de los desplazamientos químicos de ^1H -RMN de los sulfuros de partida y sus correspondientes sulfóxidos.

| Compuesto | H-2 | H-3 | H-4 | H-5 | H-6 | H-9 | H-11 | H-12 |
|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 48 | 7.30 | 6.67 | - | 6.67 | 7.30 | 8.22 | 7.68 | 6.83 |
| 88 | 7.42 | 6.60 | - | 6.60 | 7.42 | 8.21 | 7.93 | 8.52 |
| 50 | - | 7.89 | 7.51 | 7.56 | 7.80 | 8.33 | 7.70 | 6.78 |
| 90 | - | 7.84 | 7.45 | 7.45 | 7.06 | 8.21 | 8.21 | 8.47 |
| 73 | 7.26 | 8.60 | - | 8.60 | 7.26 | 8.33 | 8.04 | 7.32 |
| 91 | 7.70 | 8.65 | - | 8.65 | 7.70 | 8.21 | 7.91 | 8.38 |

Tabla 12. Comparación de los desplazamientos químicos ^1H -RMN de los sulfuros de partida y sus correspondientes sulfonas.

| Compuesto | H-2,6 | H-3,5 | H-9 | H-11 | H-12 |
|-----------|-------|-------|------|------|------|
| 48 | 7.30 | 6.67 | 8.22 | 7.68 | 6.83 |
| 89 | 7.93 | 8.04 | 8.27 | 8.00 | 8.52 |
| 73 | 7.26 | 8.60 | 8.33 | 8.04 | 7.32 |
| 92 | 7.59 | 8.11 | 8.23 | 7.93 | 8.36 |

Además, cabe destacar el diferente comportamiento de los protones H-3 y H-5 en las dos sulfonas obtenidas (**figura 39**).

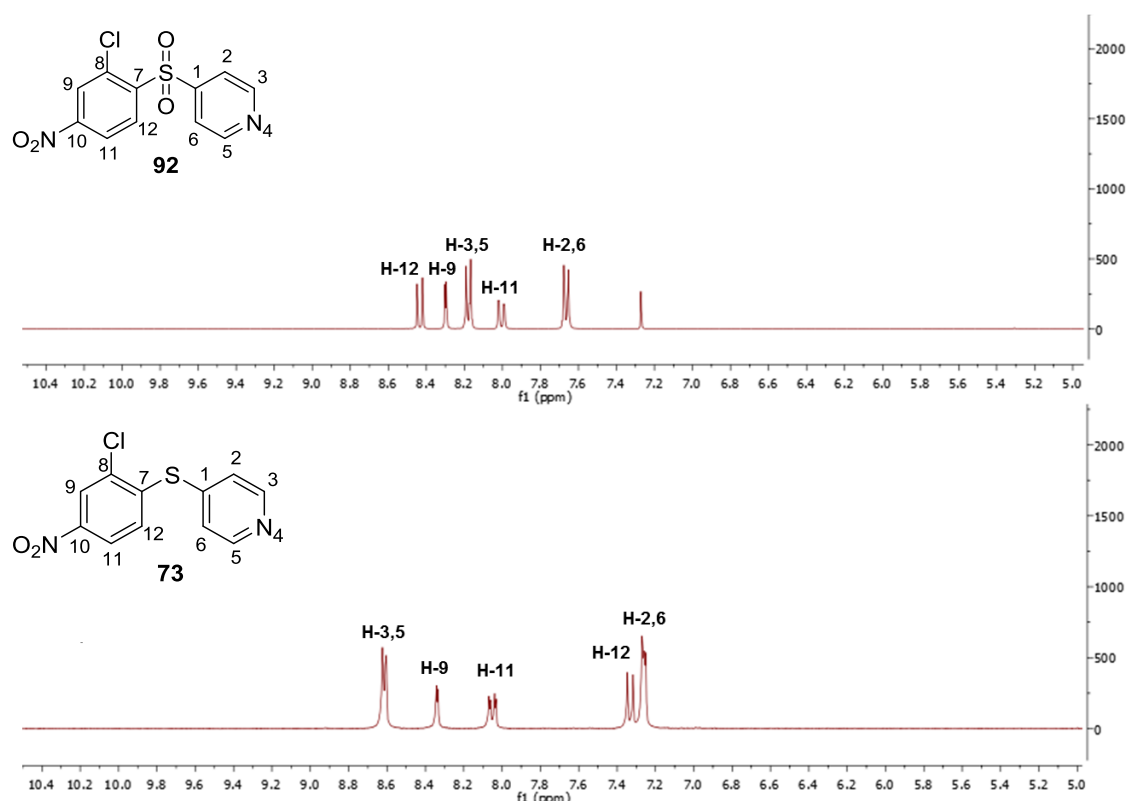


Figura 39. Comparación del espectro de ^1H -RMN de los compuestos **73** y **92**.

El grupo sulfona presenta efectos electrónico y conjugativo negativos (-I, -K), que provocarían un desapantallamiento general de las señales en RMN. Las diferencias entre ambos derivados **89** y **92** están relacionadas con la naturaleza del grupo arilo: el grupo amino presente en **89** es apantallante, debido al efecto conjugativo +K, y puede conjugarse con la sulfona en posición relativa 4, cuyo efecto conjugativo es negativo, lo que provoca un desapantallamiento en todos los protones de la molécula que afecta especialmente a H-3 y H-5 (**figura 40**). Respecto al derivado **92**, el nitrógeno de la piridina ejerce el efecto contrario: H-3 y H-5 estarán más desapantallados en el sulfuro debido a la importancia de las formas resonantes con separación de carga; sin embargo, la presencia de otro grupo electroattractor, como es el grupo sulfona, hace que dichas formas resonantes tengan menor importancia y el desapantallamiento de H-3 y H-5 sea menor (**figura 41**).

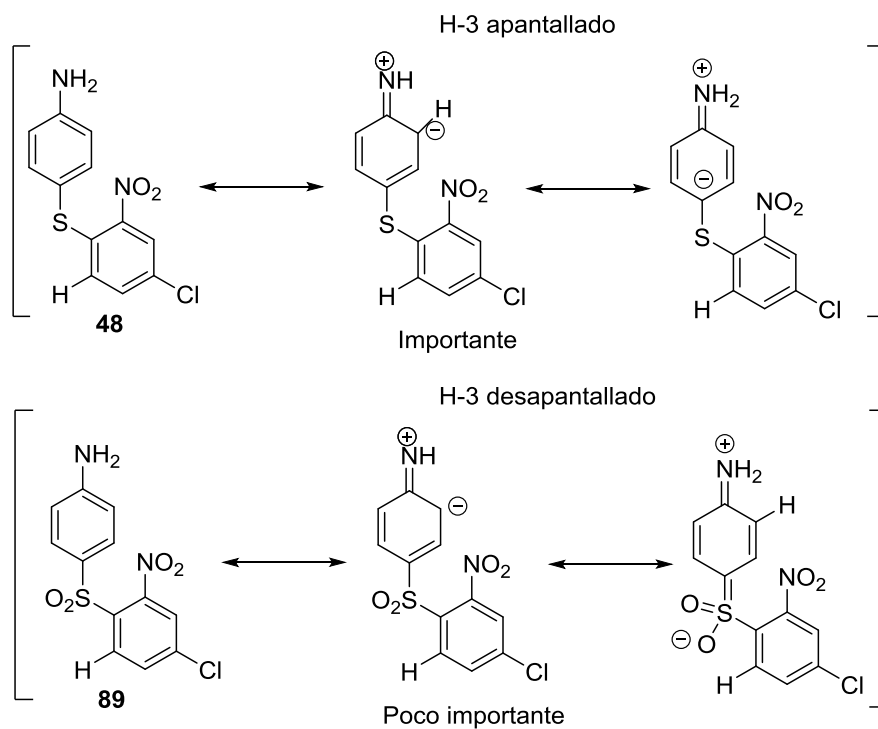


Figura 40. Formas resonantes de los compuestos **48** y **89**.

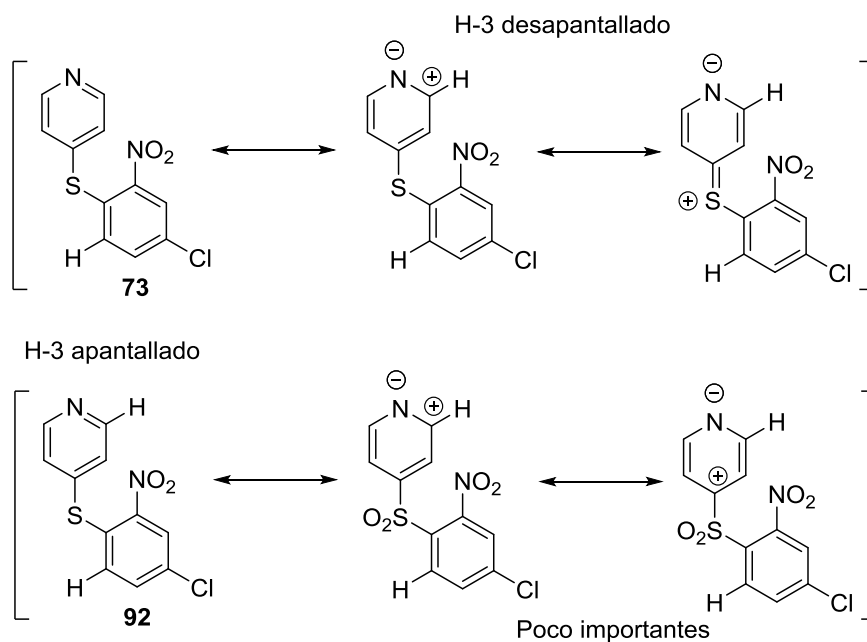
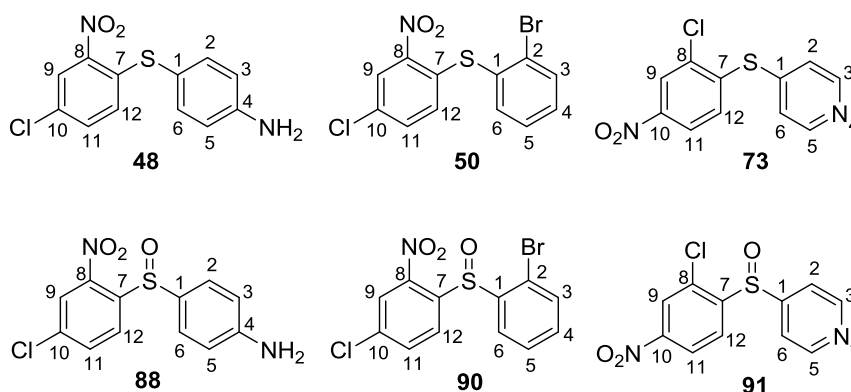


Figura 41. Formas resonantes de los compuestos **73** y **92**.

En cuanto a los espectros de ^{13}C -RMN, el efecto que sufren los desplazamientos químicos está exclusivamente relacionado con la densidad electrónica (**tabla 13**). En

ambos tipos de derivados, sulfóxidos y sulfonas, se observó que las señales de los carbonos C-1 y C-7, directamente unidos al átomo de azufre que se oxida, se encuentran desapantalladas respecto a los sulfuros de partida, debido al efecto inductivo $-I$ que presentan ambos grupos funcionales.

Tabla 13. Comparación de los desplazamientos químicos ^{13}C de los sulfuros de partida y sus correspondientes sulfóxidos.



| Compuesto | C-1 | C-2 | C-3 | C-5 | C-6 | C-7 | C-8 | C-10 | C-11 | C-12 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 48 | 111.7 | 137.2 | 115.2 | 115.2 | 137.2 | 139.9 | 144.2 | 129.1 | 134.0 | 129.0 |
| 88 | 132.4 | 128.9 | 114.7 | 114.7 | 128.9 | 143.0 | 144.9 | 137.4 | 135.1 | 127.6 |
| 50 | 130.8 | 129.5 | 134.2 | 129.7 | 137.7 | 134.4 | 145.5 | 130.6 | 134.3 | 129.6 |
| 90 | 139.6 | 123.3 | 133.6 | 129.6 | 127.7 | 144.9 | 145.3 | 137.0 | 135.7 | 129.3 |
| 73 | 142.3 | 125.0 | 150.5 | 150.5 | 125.0 | 140.3 | 134.2 | 147.2 | 123.1 | 132.6 |
| 91 | 153.0 | 118.8 | 151.0 | 151.0 | 118.8 | 149.5 | 131.8 | 150.0 | 123.2 | 126.8 |

Por otro lado, cabe destacar que, en el caso de los sulfóxidos, se observó que los carbonos C-2 y C-6 sufren un desplazamiento a campos más altos, mientras que en general C-10 se desplaza a campos más bajos. Para explicar este comportamiento es importante tener en cuenta que el grupo sulfóxido, además del efecto inductivo $-I$, puede presentar tanto efecto conjugativo $+K$, asociado al par de electrones sin compartir del azufre, como $-K$, por el doble enlace $\text{S}=\text{O}$, lo que lleva a que los desplazamientos químicos de los diferentes carbonos observados dependan del compromiso entre ambos efectos conjugativos (**figura 42**).

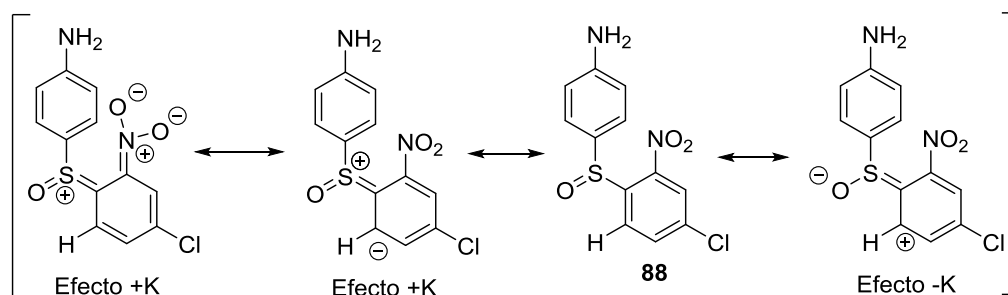
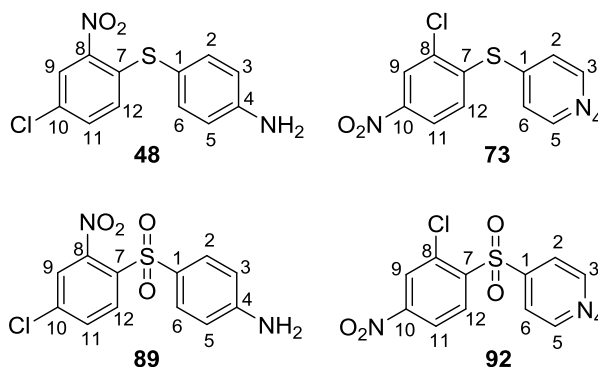


Figura 42. Formas resonantes del derivado **88**.

En cuanto a los derivados de sulfona **89** y **92**, los desplazamientos observados son el resultado de la combinación de los efectos conjugativo e inductivo negativos del grupo sulfona (-I, -K), cuyo efecto es desapantallante, y la influencia de la naturaleza de los anillos aromáticos, con los diferentes efectos conjugativos asociados explicados anteriormente (figuras 40 y 41) (tabla 14).

Tabla 14. Comparación de los desplazamientos químicos ^1H -RMN de los sulfuros de partida y sus correspondientes sulfonas.



| Compuesto | C-1 | C-2 | C-3 | C-5 | C-6 | C-7 | C-8 | C-10 | C-11 | C-12 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 48 | 111.7 | 137.2 | 115.2 | 115.2 | 137.2 | 139.9 | 144.2 | 129.1 | 134.0 | 129.0 |
| 89 | 139.1 | 128.4 | 121.8 | 121.8 | 128.4 | 145.7 | 151.6 | 141.9 | 136.2 | 128.0 |
| 73 | 142.3 | 125.0 | 150.5 | 150.5 | 125.0 | 140.3 | 134.2 | 147.2 | 123.1 | 132.6 |
| 92 | 151.2 | 126.1 | 132.4 | 134.4 | 126.1 | 142.5 | 133.6 | 134.4 | 122.4 | 139.9 |

Respecto al caso del derivado de sulfona y *N*-óxido **93**, se observó la misma tendencia que en el caso de la sulfona con respecto a los protones H-2, H-6 y, sobre todo, H-12, que se desplazan a campos más bajos. Además, cabe citar que otra observación que corroboró la presencia del grupo *N*-óxido fue el ensanchamiento de la señal de los protones H-3 y H-5, como consecuencia del aumento del tiempo de relajación que provoca el paramagnetismo de este grupo funcional, el cual depende de la inversa de la

distancia elevada a la sexta potencia, por lo que solo se observa de manera clara en estos dos protones más próximos a dicho grupo¹³² (**figura 43**).

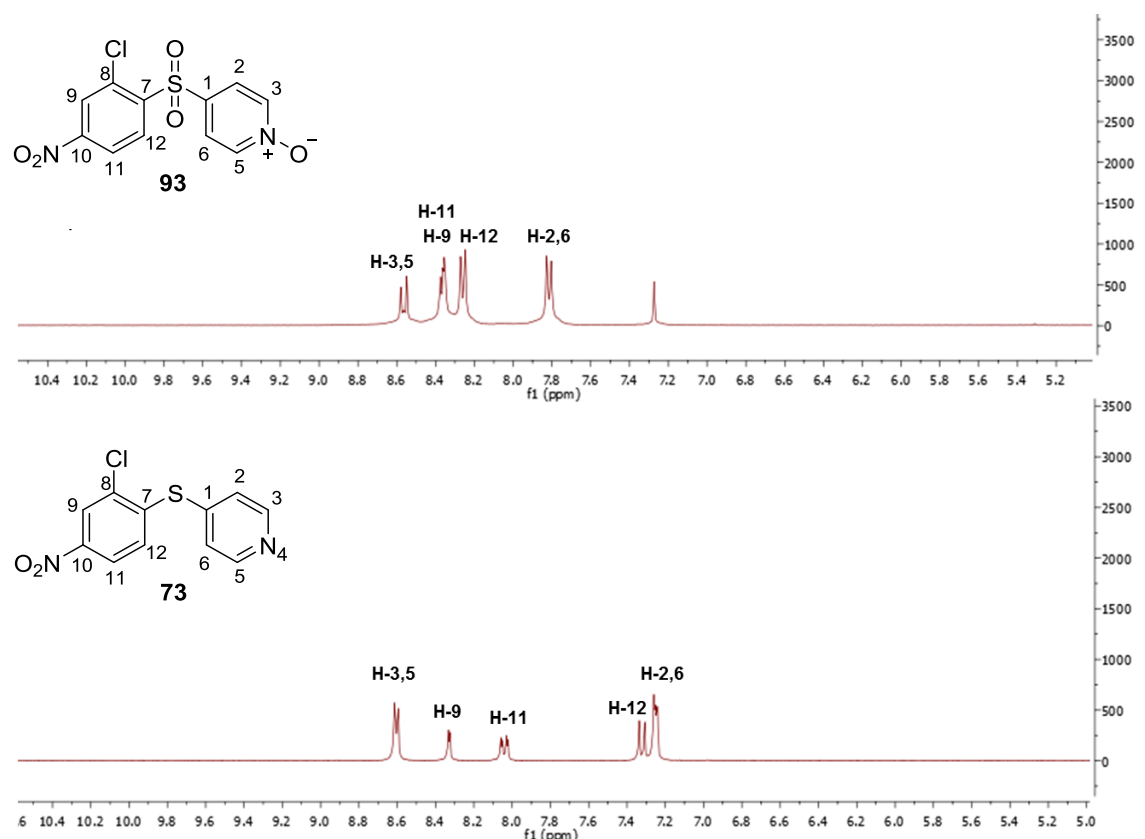


Figura 43. Comparación del espectro de ¹H-RMN de los compuestos **73** y **93**.

Estos datos de ¹H-RMN, junto con el dato correspondiente al ión molecular obtenido mediante espectrometría de masas, que corresponde con la introducción de 3 átomos de nitrógeno, permitieron confirmar la naturaleza de dicho derivado.

1.5. Evaluación enzimática de los productos de oxidación

La evaluación enzimática de estos compuestos se llevó a cabo empleando el mismo procedimiento que en los derivados de diarilsulfuro anteriores. Los resultados muestran que la oxidación del átomo de azufre reduce la potencia inhibitoria de PDE7, manteniéndose tan solo una inhibición residual en los productos de oxidación obtenidos a partir del sulfuro **73** (sulfóxido **91**, sulfona **92** y *N*-óxido **93**) (**tabla 15**).

¹³² Jahnke, W. "Spin labels as a tool to identify and characterize protein-ligand interactions by NMR spectroscopy" *ChemBioChem* **2002**, 3, 167-173.

Tabla 15. Evaluación enzimática de los productos de oxidación obtenidos. Todos los compuestos se ensayaron inicialmente a una concentración 10 μ M.

| Compuesto | PDE7A %inh @10 μ M | PDE7A CI_{50} (μ M) |
|-----------------|------------------------|----------------------------|
| BRL50481 | 99.2 \pm 2.1 | 0.09 \pm 0.02 |
| 88 | 27.4 \pm 0.9 | - |
| 90 | 27.6 \pm 3.1 | - |
| 91 | 79.2 \pm 1.9 | 1.70 |
| 89 | 17.9 \pm 3.4 | - |
| 92 | | 7.5 |
| 93 | 75.2 \pm 6.2 | 1.40 |

1.6. Oxidación metabólica *in vitro* de los derivados de diarilsulfuro

Dada la eficacia mostrada por el compuesto **48** en modelos celulares de la enfermedad de Parkinson así como la ausencia de efectos eméticos ligados a su administración *in vivo*, nos pareció interesante estudiar el proceso de metabolización *in vitro* de dicho derivado.

Una vez que un determinado fármaco ejerce su acción terapéutica, éste debe ser metabolizado y eliminado de nuestro organismo. Entendemos como metabolismo de un fármaco a toda aquella conversión química o transformación que lo convierte en una sustancia más fácil de eliminar. Normalmente, esta serie de transformaciones inactivan finalmente al fármaco, pero también pueden dar lugar a metabolitos activos, o incluso tóxicos en algunos casos. Dentro de este proceso de metabolización, tenemos 2 fases, en las que se dan reacciones de funcionalización y de conjugación, respectivamente, procesos que facilitan la eliminación renal o biliar de los metabolitos formados (**figura 44**).

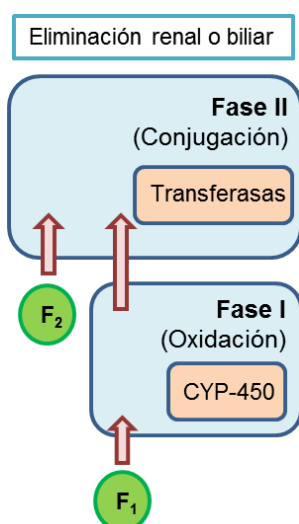


Figura 44. Representación de las fases del metabolismo de fármacos.

En la fase I, predominan las reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, si bien las oxidaciones son las reacciones más frecuentes. Éstas son llevadas a cabo por enzimas oxigenasas presentes en los microsomas hepáticos fundamentalmente, siendo el sistema del citocromo P450 (CYP450) el más importante.

Las CYP450 son hemoproteínas catalíticas en las cuales un grupo tiol del aminoácido cisteína sirve como quinto ligando al átomo de hierro del grupo hemo. Aunque el sistema P450 puede catalizar una gran variedad de procesos, interviene fundamentalmente en reacciones de oxidación, en las que en general se requiere oxígeno molecular y NADPH para que ésta se lleve a cabo. Son reacciones de monooxigenación en las que sólo uno de los átomos de oxígeno es incorporado en la molécula del sustrato, mientras que el otro es reducido hasta agua (**figura 45**). Entre las oxidaciones catalizadas por el CYP450 se incluyen hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, epoxidaciones y *N*- y *S*-oxidaciones, entre otras.



Figura 45. Reacción de oxidación llevada a cabo por el sistema CYP450.

De manera general, cuando aparece un grupo sulfuro en una molécula, éste es fácilmente convertido en sulfóxido gracias a la fácil accesibilidad que presentan los pares de electrones libres del átomo de azufre en los mismos, en los que aparece como átomo divalente¹³³. Por ello, se pensó en llevar a cabo el tratamiento del derivado **48** con microsomas hepáticos de rata, de manera que pudiéramos estudiar las transformaciones que el sulfuro **48** sufre por la acción del sistema CYP450, presente en los microsomas empleados.

Para llevar a cabo este experimento, se utilizó una disolución de microsomas hepáticos de rata, comercialmente disponible a una concentración de 20mg/mL. Así se preparon dos muestras en paralelo, conteniendo ambas una disolución del derivado de diarilsulfuro **48** en DMSO, una disolución de tampón fosfato salino para fijar el pH a 7.4, una disolución acuosa de MgCl₂ y los microsomas. De las dos muestras así preparadas, una de ellas se empleó como muestra control del experimento, mientras que en la otra se añadió el cofactor NADPH, responsable de desencadenar la reacción enzimática deseada. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

Una vez añadido el NADPH, se monitorizó la reacción enzimática llevada a cabo por los microsomas mediante HPLC-MS, analizando alícuotas de dicha muestra a los tiempos

¹³³ Ziegler, D.M. "Bioactivation of xenobiotics by flavin-containing monooxygenases" *Adv. Exp. Med. Biol.* **1991**, 283, 41-50.

de reacción de 15, 30 y 60 minutos con el fin de estudiar la evolución de la misma. Las muestras analizadas por HPLC-MS se prepararon tomando 150 μL del experimento en cuestión y añadiendo 150 μL de acetonitrilo con el fin de detener la reacción enzimática. A continuación, estas alícuotas se centrifugaron para que los microsomas precipitaran, y se tomaron 200 μL del sobrenadante, que fueron directamente inyectados en el HPLC-MS, registrándose los cromatogramas de cada una de las muestras preparadas (**figura 46**).

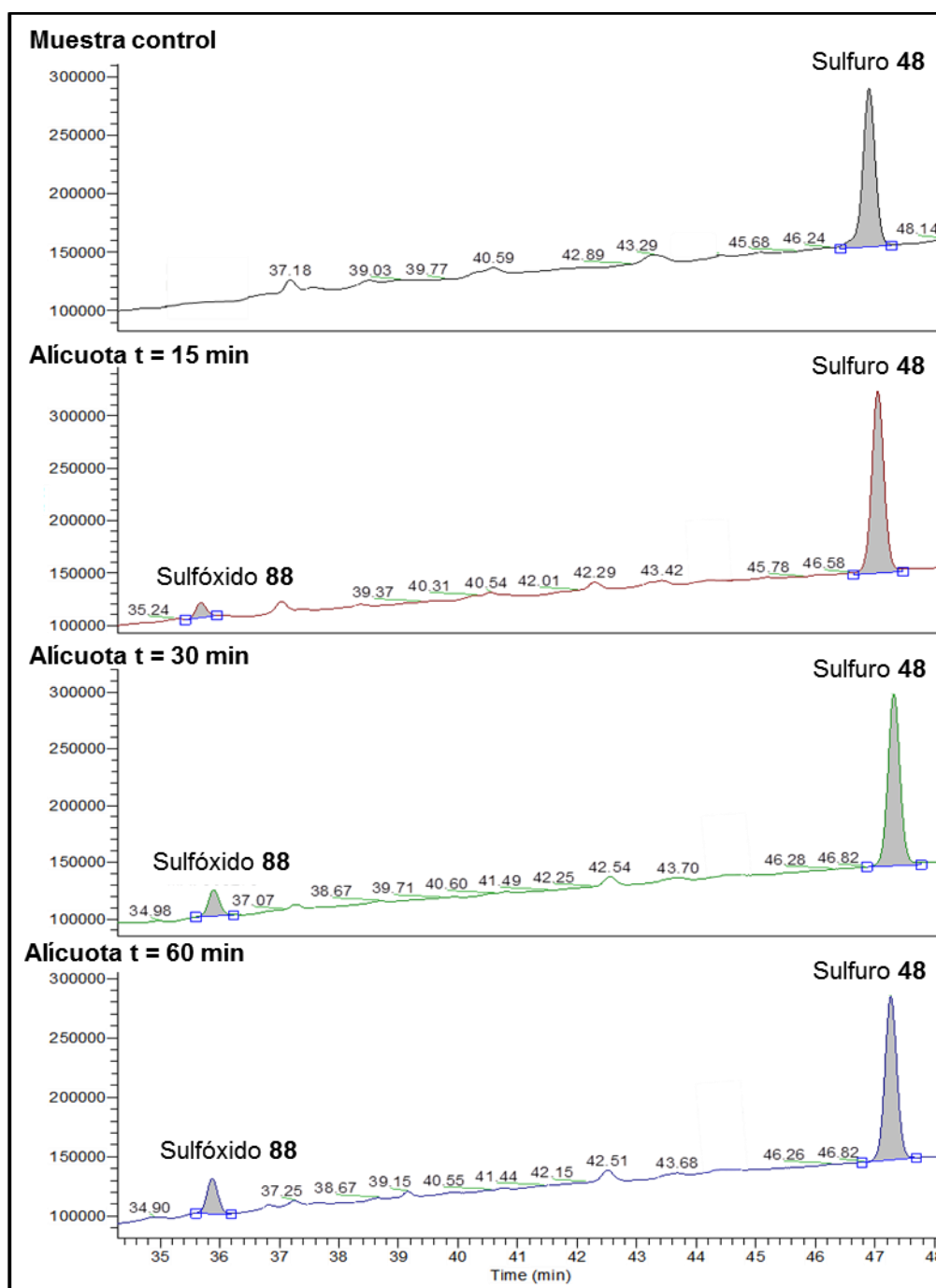


Figura 46. Cromatogramas registrados para el experimento de la reacción enzimática empleando microsomas de rata a diferentes tiempos.

Cabe decir que, puesto que previamente se habían aislado y caracterizado los productos correspondientes a la oxidación del derivado **48**, se registraron previamente los cromatogramas de HPLC-MS del sulfuro así como de sus productos de oxidación **88** y **89**, con el fin, por un lado, de elegir las condiciones más adecuadas para la identificación de los picos de absorción correspondientes a dichos derivados; y por otro lado, para utilizarlos como compuestos de referencia a la hora de identificar los productos formados en la reacción de oxidación metabólica.

Basándonos en las integrales correspondientes a los picos de absorción obtenidos en los diferentes cromatogramas, se calcularon los porcentajes de sulfuro y sulfóxido en cada una de las alícuotas analizadas (**tabla 16**).

Tabla 16. Porcentajes de sulfuro y sulfóxido a los diferentes tiempos analizados mediante HPLC-MS.

| Alícuota | % Sulfóxido 88 | % Sulfuro 48 |
|------------|----------------|--------------|
| t = 15 min | 6.5% | 93.5% |
| t = 30 min | 12.4% | 87.6% |
| t = 60 min | 16.9% | 83.1% |

Este experimento nos permitió concluir que el único metabolito obtenido como resultado del tratamiento del sulfuro **48** con los microsomas de rata es el derivado de sulfóxido **88**, y que además la formación de dicho metabolito apenas alcanza un porcentaje de un 20% al cabo de una hora. Dado que dicho sulfóxido no es activo frente a PDE7A (**tabla 15**), este estudio de metabolismo *in vitro* avala que la concentración del inhibidor **48** seguiría siendo elevada a pesar de la acción del CYP450 al cabo de una hora, y por lo tanto podría ejercer el efecto terapéutico deseado antes de ser completamente metabolizado. Además, se llevó a cabo el mismo tratamiento con el sulfuro **73**, y se observó el mismo comportamiento que en el caso del compuesto **48**, obteniéndose como producto principal tras el tratamiento con los microsomas el sulfóxido **91**. Por tanto, con este estudio llevado a cabo *in vitro* podemos asumir que la metabolización de este tipo de derivados de sulfuro comienza con la oxidación del átomo del azufre, transformándose en sulfóxido.

*En este capítulo se han diseñado inhibidores de PDE7 análogos del derivado de tioxoquinazolina **S14**, compuesto cuyo desarrollo clínico está en curso, habiéndose obtenido compuestos activos basados en pequeñas modificaciones de la estructura de dicho compuesto, presentando algunos de ellos un perfil farmacológico adecuado para*

utilizarse como compuestos de reemplazo del mismo. Además, se ha desarrollado una nueva familia de inhibidores de PDE7 basados en la estructura de un diarilsulfuro identificado a partir de un cribado fenotípico en un modelo celular de la enfermedad de Parkinson, caracterizando sus propiedades biológicas y ADME como la permeabilidad al SNC o el metabolismo hepático. Además, se ha demostrado la ausencia de efectos eméticos asociados a esta y otras familias de inhibidores de PDE7¹²⁹.

2. IDENTIFICACIÓN Y DESARROLLO DE NUEVOS INHIBIDORES DE PDE10A PARA SU ESTUDIO EN MODELOS DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

2.1. Introducción

El elevado nivel de expresión de PDE10A en el estriado, y la distribución única de esta enzima en esta parte del cerebro ha llevado a estudiar el papel de la misma en la función de las neuronas espinales, las cuales constituyen el principal punto de entrada y salida de información en el circuito de los ganglios basales. Las enfermedades en las que esta zona cerebral está implicada incluyen, por ejemplo, enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia, y, de hecho, algunos inhibidores de PDE10A han alcanzado fases clínicas en el tratamiento de esta patología¹³⁴. Además, el circuito de los ganglios basales se asocia también con el control de las funciones motoras, hecho que sugiere que los inhibidores de PDE10A podrían encontrar también una importante aplicación en el tratamiento de enfermedades neurológicas que presentan síntomas motores asociados, tales como la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson⁸⁸. La enfermedad de Huntington está causada por un defecto genético en el gen de la *Huntingtina*, proteína implicada en la función sináptica¹³⁵ localizada en el cromosoma 4, siendo por tanto una enfermedad de carácter hereditario. Las manifestaciones clínicas incluyen movimientos espasmódicos y coreáticos, pero también trastornos psiquiátricos como alucinaciones o psicosis, pérdida de peso y, por supuesto, demencia¹³⁶. Al igual que ocurre en el resto de las enfermedades neurodegenerativas, no existe a día de hoy un tratamiento farmacológico modificador de la neurodegeneración. La eficacia de los inhibidores de PDE10A en modelos animales de esta enfermedad ha sido probada en varias ocasiones y, de hecho, algunos de estos inhibidores están siendo actualmente estudiados como potenciales fármacos para el tratamiento de esta enfermedad en fases clínicas¹³⁷.

Por otro lado, puesto que la enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa en la que también existen alteraciones motoras, la inhibición de PDE10A podría constituir una estrategia terapéutica adecuada para el tratamiento de la misma. Además, dada la presencia de un proceso inflamatorio que conduce a la muerte de las neuronas dopaminérgicas en esta enfermedad, en el que los niveles de AMPc juegan un papel muy importante, la inhibición de PDE10 como enzima expresada en el

¹³⁴ Compuestos en fases clínicas para esquizofrenia (octubre 2014): **Tak063** (Fase I), **RG7203** (Fase I), **AMG579** (Fase I), **OMS824** (Fase IIa finalizada).

¹³⁵ Huntington's disease collaborative research group "A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes", *Cell*, **1993**, 72, 971-983.

¹³⁶ Roos, R.A.C. "Huntington's disease: a clinical review", *Orphanet J. Rare Dis.*, **2010**, 5, 40-47.

¹³⁷ Compuestos en fases clínicas para enfermedad de Huntington (octubre 2014): **PF02545920** (Fase II).

estriado y capaz de controlar los niveles de este nucleótido en esta zona, podría constituir una potencial estrategia terapéutica novedosa para reducir la reacción inflamatoria y, por tanto, retrasar o parar la progresión de la muerte neuronal.

Con el fin de estudiar la posible utilidad de PDE10A como diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, se propuso el desarrollo de nuevos inhibidores de esta enzima que nos pudieran servir como herramientas farmacológicas en modelos celulares y quizás como candidatos a fármaco.

2.2. Identificación de nuevos prototipos mediante cribado virtual en el centro activo de la enzima

Existen una gran variedad de métodos que permiten, a día de hoy, la identificación de nuevos prototipos o cabezas de serie en el desarrollo de nuevos candidatos a fármacos. Dentro de estos, el empleo de técnicas computacionales ha constituido en las últimas décadas una buena estrategia no sólo para la identificación de nuevos prototipos o cabezas de serie capaces de interaccionar con el receptor o diana terapéutica de interés, sino también como herramienta en el proceso de optimización de los mismos hasta convertirse en candidatos adecuados para estudios farmacológicos más avanzados *in vitro* e incluso *in vivo*¹³⁸.

En cuanto al proceso de identificación de nuevos prototipos capaces de inhibir o activar un determinado receptor, podemos encontrarnos con dos situaciones bien diferenciadas: que la estructura del receptor no sea conocida o que sí lo sea. En el segundo de los dos casos, una metodología ampliamente utilizada para la identificación de nuevos cabezas de serie es el cribado virtual de ligandos basado en la estructura de la enzima o del receptor en cuestión. Esta metodología ha cobrado mucha importancia en los últimos años gracias a los avances tanto en las técnicas de cristalización de proteínas, lo cual ha hecho que se tenga disponible a día de hoy un gran número de estructuras cristalográficas de diversas enzimas¹³⁹, como en la quimioinformática, que han permitido que estos estudios puedan llevarse a cabo con un grado de éxito cada vez mayor. El papel de la quimioinformática en la fase inicial del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos radica en que permite identificar moléculas con una alta probabilidad de interaccionar con una diana determinada, todo ello *in silico*, con la consecuente reducción del tiempo de trabajo sintético y del coste económico.

¹³⁸ Kitchen, D.B.; Decornez, H.; Furr, J.R.; Bajorath, J. "Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications" *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, 3, 935-949.

¹³⁹ Mori, M.; Ogawa, N.; Tanikawa, K.; Dodo, S.; Shibayama, S.; Yokoyama, S.; Tanaka, A. "Contribution of structural biology to clinically validated target proteins" *Drug Discov. Today* **2008**, 13, 469-472.

El cribado virtual sobre la estructura de una determinada diana se basa en lo que se conoce como proceso de acoplamiento molecular o *docking*, el cual permite identificar la conformación preferida de una molécula, al unirse a otra, con el fin de formar un complejo termodinámicamente estable. Así, se definen el conjunto de ligandos y la zona del receptor en la que se pretende estudiar la interacción, y empleando el programa elegido, se obtiene como resultado un conjunto de soluciones que muestran cómo cada uno de los compuestos interacciona con nuestra diana, llevando cada una de ellas una función de puntuación asociada (función de *score*) que permite conocer cómo de favorable energéticamente es la interacción entre ambas moléculas¹⁴⁰. Las posibilidades de éxito vienen determinadas por la elección del programa informático adecuado, teniendo en cuenta el compromiso entre el tiempo de cálculo y una predicción lo más acertada posible del modo de unión de los compuestos en el receptor.

Dada la utilidad de esta técnica para la identificación de nuevos inhibidores y la disponibilidad de numerosas estructuras cristalográficas de la enzima PDE10A en el *Protein Data Bank* (PDB) (<http://www.rcsb.org>), decidimos llevar a cabo un cribado virtual empleando las estructuras disponibles en nuestra quimioteca interna de compuestos como conjunto de moléculas, que consta de unos 900 heterociclos todos ellos de bajo peso molecular (PM < 500). Este trabajo se realizó con el asesoramiento del Profesor Francisco Javier Luque en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona gracias a una estancia de 10 semanas que realicé en sus laboratorios. En el momento en que se desarrolló este trabajo, había disponibles en el PDB 38 estructuras de PDE10A cristalizadas, de las cuales no se tuvieron en cuenta aquellas que presentaban algún tipo de mutación ni tampoco la correspondiente a la estructura del dominio GAF, que pertenece al dominio regulador de esta proteína. Así, de entre todas las estructuras disponibles del dominio catalítico de la enzima, se seleccionó la estructura de PDE10A correspondiente al código 2OUP²² del PDB perteneciente a la especie *Homo Sapiens* (figura 47).

¹⁴⁰ Mitchel, J.B.O. "Informatics, machine learning and computational medicinal chemistry" *Future Med. Chem.* **2011**, 3, 451-467.

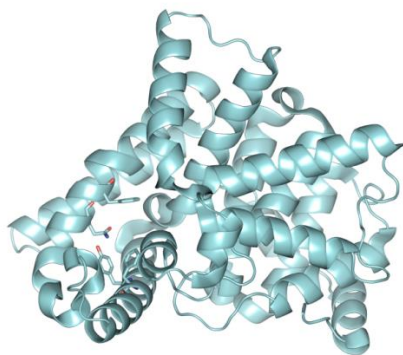


Figura 47. Estructura de PDE10A (PDB: 2OUP) sobre la que se realizaron los estudios de cribado virtual.

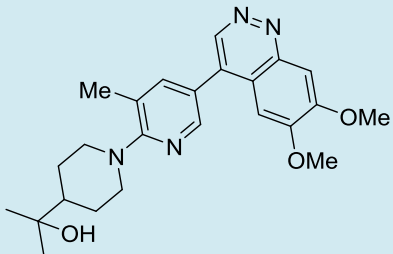
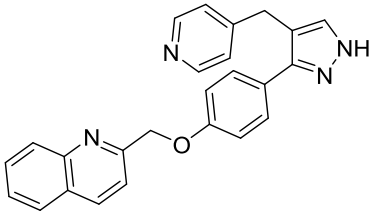
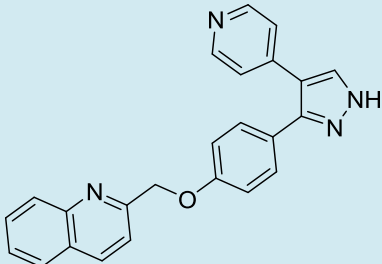
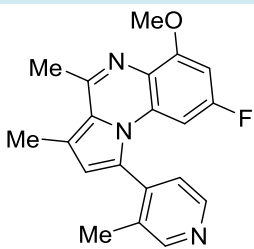
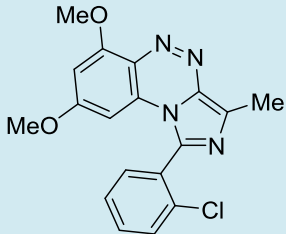
El programa utilizado para llevar a cabo el cribado virtual fue rDock¹⁴¹, basado en un algoritmo genético y en el que la función de puntuación total se obtiene como una suma ponderada de las interacciones intermoleculares ligando-receptor, las intramoleculares del ligando y las correspondientes al sitio de unión en la proteína. Estas energías son calculadas en base a interacciones de van der Waals, interacciones polares atractivas y repulsivas, y un potencial de desolvatación que depende de la superficie accesible al disolvente que presenta la cavidad de la proteína estudiada.

El cribado virtual de estos ligandos se llevó a cabo en el sitio activo del dominio catalítico de la enzima, siguiendo el procedimiento detallado en la parte experimental. Como controles para llevar a cabo el estudio se emplearon diferentes ligandos que se encuentran cristalizados con la enzima PDE10A en el PDB (**tabla 17**). Para definir la cavidad, se llevó a cabo una superposición de los diferentes ligandos cristalizados empleados como control, generándose un ligando imaginario que abarcaba todo el espacio disponible en el sitio de unión de la enzima.

En primer lugar, se realizaron los estudios de docking de los ligandos control (50 poses por ligando), y se analizaron las soluciones obtenidas con el fin de comprobar que éstas mantenían el modo de unión presente en los complejos cristalográficos. Se observó que los ligandos mantenían dicho modo de unión, mostrando las mejores soluciones interacciones con los mismos aminoácidos del sitio activo que en el cristal (**tabla 17**). A continuación, se llevó a cabo el cribado virtual de todos los ligandos de la quimioteca junto con los controles, y se ordenaron las 50 soluciones obtenidas para cada uno de ellos según la puntuación total asignada por el programa rDock.

¹⁴¹ Ruiz-Carmona, S.; Alvarez-Garcia, D.; Foloppe, N.; Garmendia-Doval, A.B.; Juhos, S.; Schmidtke, P.; Barril, X.; Hubbard, R.E.; Morley, S.D. "rDock: a fast, versatile and open source program for docking ligands to proteins and nucleic acids" *PLoS Comput. Biol.* **2014**, 10, e1003571.

Tabla 17. Inhibidores de PDE10A empleados como controles en el cribado virtual, sus principales interacciones y el score total asociado.

| Código PDB | Estructura ligando | Interacciones | Score total ^a |
|--------------------------|---|--|--------------------------|
| 4DDL (35 nM) |  | Gln726 Phe729 Phe696, Phe729, Ile711, Leu635, Ile692 | -38.59 |
| 3HQY (1.5 nM) |  | Gln726, Ser677 Phe729 Phe696, Phe729, Gly725, Ile692, Met713, Glu721 | -35.23 |
| 3HQZ (0.42 nM) |  | Tyr693 Phe729 Phe729, Gly725, Ile692, Met713, Glu721, Pro712, Tyr693 | -45.58 |
| 3SN7 (0.7 nM) |  | Gln726 Phe729 Phe696, Leu635, Phe729, Ile692 | -39.31 |
| 4FCD (0.28 nM) |  | Gln726 Phe729 Phe696, Met713, Phe729 | -42.41 |

* El código de colores se indica a continuación: azul (interacción por puente de hidrógeno); rosa (interacción aromática); negro (interacción hidrofóbica).

^a Score resultante de los estudios de *docking*.

A continuación, teniendo en cuenta la puntuación total obtenida para los controles, se seleccionaron aquellos ligandos con una puntuación igual o mejor que éstos para su inspección visual en Pymol, lo que nos permitió seleccionar los diferentes prototipos (**tabla 18**). Todos ellos presentan enlace de hidrógeno con la Gln726 o con la Tyr693, al igual

que los controles. Además, siempre aparece una interacción aromática con Phe696 o Phe729, así como diferentes interacciones hidrofóbicas comunes con residuos como Phe696, Phe729, Met713, Gly725, Ile692, entre otros. Como novedad respecto a los controles cabe destacar en el caso de los imidazoles la presencia de una interacción por puente de halógeno¹⁴⁴, en la que el grupo hidroxilo de la Tyr693 interacciona con un átomo de Br.

Tabla 18. Ligandos de la quimioteca seleccionados como prototipos a partir del cribado virtual, sus principales interacciones y el score total asociado.

| Compuesto | Interacciones | Score total ^a |
|-----------|--|--------------------------|
| 20 | Tyr693 Phe696 Phe696, Phe729, Met713, Gly725, Ile692 | -40.51 |
| 21 | Tyr693 Phe696 Phe696, Phe729, Met713, Gly725, Ile692 | -40.29 |
| 22 | Tyr693 Phe696 Phe696, Phe729, Met713, Gly725, Ile692 | -41.01 |
| 23 | Tyr693 Phe696 Phe696, Phe729, Met713, Gly725, Ile692 | .39.20 |
| Qui22 | Tyr693 Phe696 Phe696, Phe729, Met713, Gly725, Ile692 | -39.28 |
| Qui39 | Tyr693 Phe696 Phe696, Phe729, Met713, Gly725, Ile692 | -40.52 |
| Qui60 | Tyr693 Phe696, Phe729, Met713 | -39.00 |
| ltd60 | Tyr693 Phe696, Phe729, Met713, Gly725, Ile692 | -34.12 |
| Im1 | Gln726, Tyr524 Tyr693 Phe729 Phe696, Tyr524, Phe729 | -40.57 |
| Im9 | Gln726 Tyr693 Phe729 Phe696, Tyr524, Phe729 | -38.89 |
| Im41 | Gln726 Phe729 Phe696, Tyr524, Phe729, Leu665, Ile692, Leu625 | -37.85 |

* El código de colores se indica a continuación: azul (interacción por puente de hidrógeno); rosa (interacción aromática); negro (interacción hidrofóbica).

^a Score resultante de los estudios de *docking*.

A continuación, se midió la capacidad inhibitoria de los derivados seleccionados frente a la enzima PDE10A de forma experimental. Esta evaluación enzimática fue llevada a cabo en colaboración con el grupo de las Profesoras M. I. Cadavid y M. I. Loza de la Universidad de Santiago de Compostela, utilizando un ensayo radiométrico basado en la

co-incubación del enzima recombinante humano PDE10A con el ^3H -AMPC, siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía¹²⁹. Inicialmente, los compuestos se ensayaron a una concentración de 10 μM para calcular el porcentaje de inhibición, y cuando éste era mayor del 50%, se determinó la curva dosis-respuesta que permitió calcular la CI_{50} (**figura 48**).

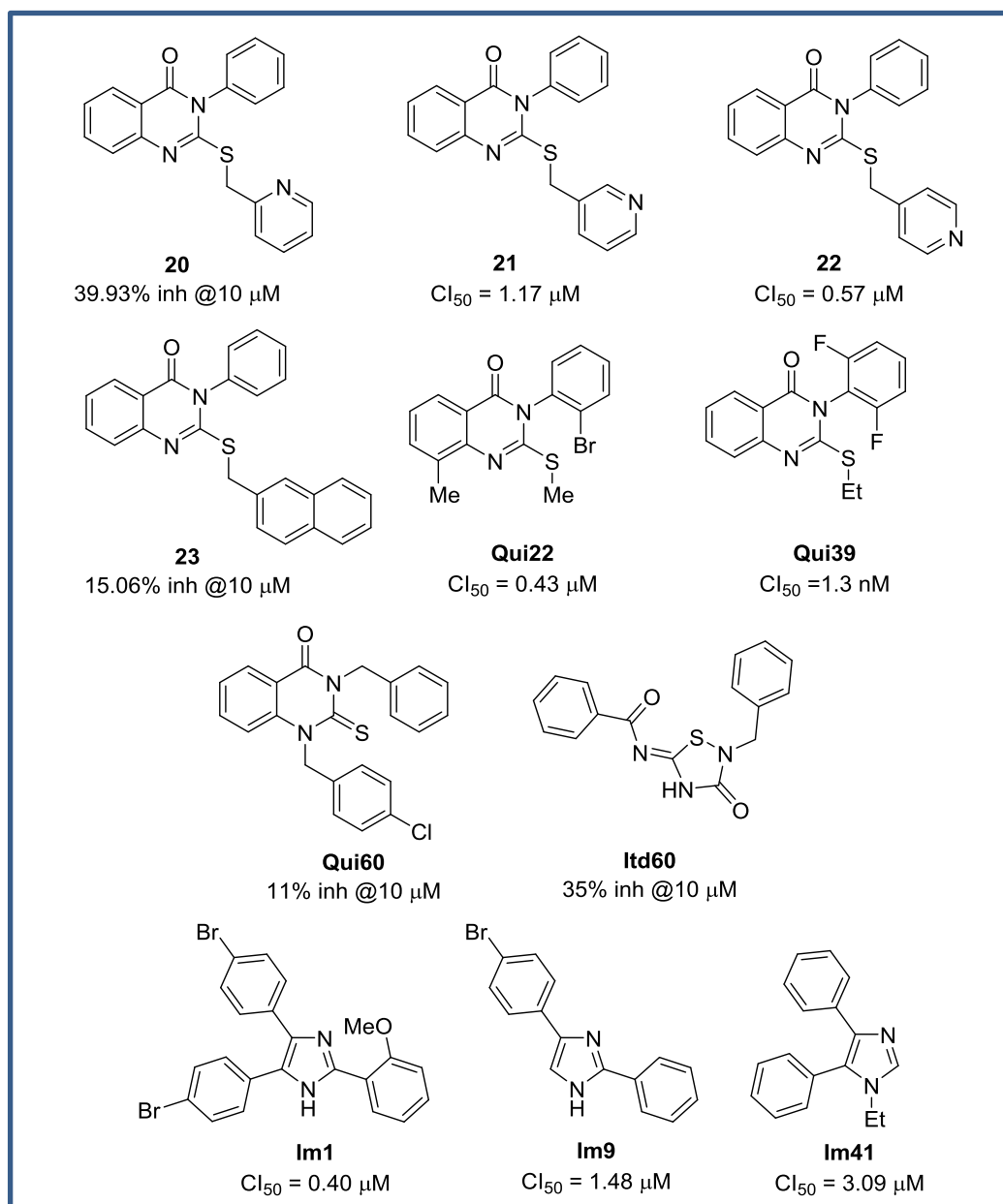


Figura 48. Cabezas de serie identificados mediante el cribado virtual en el centro activo de PDE10A y sus actividades en dicha enzima expresadas como porcentajes de inhibición a una concentración de 10 μM o como valores de CI_{50} .

Tal y como se muestra en la **figura 48**, los prototipos identificados mediante el cribado virtual de nuestra quimioteca interna de compuestos en el sitio activo del dominio catalítico

de PDE10A pertenecen a tres familias químicas diferentes: tioxoquinazolinas, iminotiadiazoles e imidazoles.

El derivado de iminotiadiazol (**Itld60**) no presentó actividad enzimática en el ensayo experimental con la enzima. En cuanto a la familia de las tioxoquinazolinas previamente desarrolladas como inhibidores de PDE7, vemos como algunas de ellas también muestran actividad inhibitoria en la enzima PDE10A. Por otro lado, destacar que los derivados de imidazol identificados, presentan diferente tipo de sustitución.

Así, este cribado virtual nos permitió seleccionar los derivados de tioxoquinazolina así como los derivados de imidazol, con el fin de desarrollar nuevos inhibidores de PDE10A y seleccionar los mejores candidatos para estudiar su comportamiento en diversos modelos de la enfermedad de Parkinson.

2.2.1. Derivados de tioxoquinazolina como inhibidores de PDE10A

Según los resultados de la **figura 48**, puede verse como los derivados de tioxoquinazolina identificados como inhibidores de PDE10A pertenecen a una familia de compuestos previamente desarrollados como inhibidores de PDE7, tal y como se ha descrito en el primer capítulo de la presente tesis doctoral. La inhibición dual de PDE7 y PDE10A por parte de derivados con potencial terapéutico para la enfermedad de Parkinson no tiene, en un principio, ningún inconveniente relacionado con efectos no deseados, puesto que ambas enzimas presentan elevados niveles de expresión en estriado y no se ha descrito hasta la fecha ningún efecto adverso relacionado con la inhibición de las mismas.

El modo de unión de estos derivados en el sitio activo de PDE10A presenta, en general, dos interacciones conservadas en todas ellas: por un lado, y muy importante, se establece un enlace de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de la Tyr693 y el nitrógeno del anillo de tioxoquinazolina, que a su vez interacciona con la conservada Gln726; por otro lado, cabe destacar las interacciones del esqueleto de tioxoquinazolina con la Phe729 y la del anillo aromático unido al nitrógeno de la posición 3 de dicho esqueleto con la Phe696, aminoácidos conservados en el sitio activo de la mayoría de las PDEs (**figura 49**). Además, cabe destacar que todas las tioxoquinazolinas identificadas como inhibidores de PDE10A se engloban en el grupo de las *S*-alquiladas, no habiéndose identificado ningún derivado perteneciente al grupo de quinazolinas sin alquilar como inhibidor de PDE10A en el cribado virtual realizado. Por ello, se decidió seleccionar algunos de los derivados de tioxoquinazolina no alquilados que presentasen actividad biológica en PDE7A, y llevar a cabo su evaluación enzimática en la enzima PDE10A, con el fin de comparar los valores de inhibición obtenidos en ambas fosfodiesterasas (**tabla 19**).

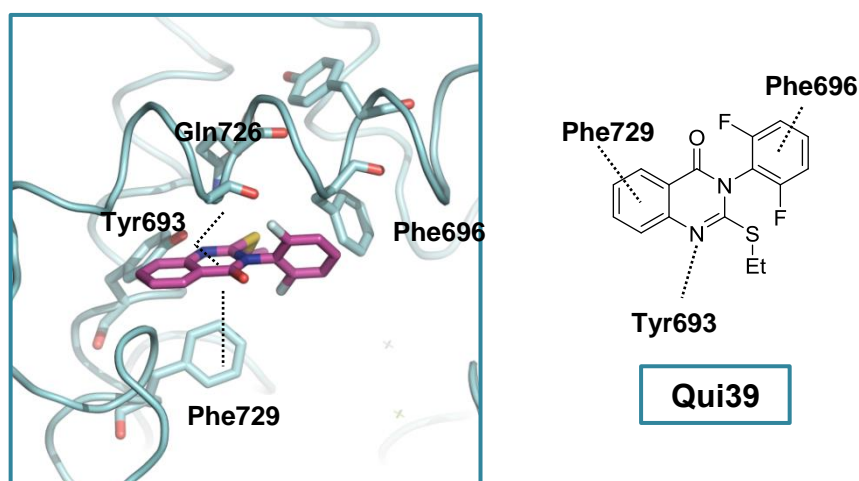
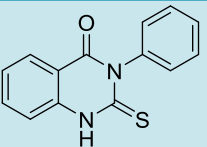
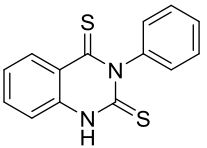
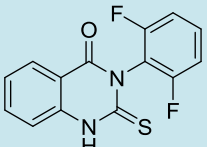
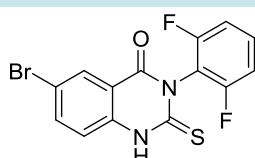


Figura 49. Modo de unión obtenido para el derivado **Qui39** en el sitio catalítico de la enzima PDE10A.

Tabla 19. Evaluación enzimática en PDE10A de derivados de tioxoquinazolina no alquilados. Los porcentajes de inhibición se calcularon a una concentración de 10 μM .

| Compuesto | Estructura | PDE7A CI_{50} (μM) | PDE10A % inh @10 μM |
|-----------|---|---|-----------------------------------|
| S14 |  | 4.68 | 44.6 |
| Qui6 |  | 0.55 | 46.1 |
| Qui49 |  | 0.48 | 46.1 |
| Qui29 |  | 11.0 | 50.7 |

Los resultados de actividad inhibitoria mostraron que los derivados de tioxoquinazolina no alquilados eran notablemente más activos en PDE7A que en PDE10A.

Por otro lado, en relación a la inhibición de PDE7A, un trabajo llevado a cabo previamente en nuestro grupo de investigación demostró que la alquilación en el azufre hacía que estos derivados de tioxoquinazolina pasaran de ser inhibidores reversibles de

tipo mixto a inhibidores competitivos con AMPc. El dato de inhibición mixta reveló la posibilidad de que PDE7A presentase en su superficie alguna otra cavidad capaz de albergar un ligando, aparte del sitio de unión del AMPc, que fue identificada mediante un análisis teórico de la superficie de la enzima¹⁴². Basándonos en este hecho, se decidió llevar a cabo un análisis computacional de la superficie del dominio catalítico de PDE10A con el fin de identificar las diferencias entre ambas fosfodiesterasas (PDE7A y PDE10A) que pudieran explicar los diferentes valores de actividad enzimática obtenidos para los derivados de tioxoquinazolina en ambas enzimas.

Existen diversos programas que permiten la búsqueda y detección de cavidades en la superficie de grandes moléculas, clasificándose en 2 tipos en función del algoritmo que emplean: evolutivo y basado en la estructura. Dentro de éste último tipo, existe una segunda división que diferencia entre algoritmos geométricos o energéticos. Entre todos los programas existentes, F-Pocket, que emplea un algoritmo de tipo genético, fue el programa elegido para el análisis computacional llevado a cabo en nuestro grupo sobre la enzima PDE7A, y por ello se eligió el mismo programa para llevar a cabo el presente estudio en PDE10A.

De todas las estructuras del dominio catalítico de PDE10A depositadas en el PDB, se seleccionaron todas aquellas que eran humanas (especie *Homo Sapiens*) y que no presentaban ningún tipo de mutación en su secuencia de aminoácidos. Así, se disponía en ese momento de 15 estructuras diferentes cristalizadas con diferentes inhibidores descritos, con AMPc o sin ligando. F-Pocket¹⁴³ está basado en la teoría geométrica de α -esferas y emplea, básicamente, una secuencia consistente en tres pasos para llevar a cabo la búsqueda de posibles sitios de unión a lo largo de toda la superficie de la proteína: primero, el programa genera sobre la superficie del receptor fruto de estudio, esferas que sean tangenciales a cuatro átomos de dicha superficie y que carezcan de átomos en el interior de las mismas. Una vez generadas, identifica conjuntos de esferas cercanas en el espacio para identificar bolsillos y eliminar regiones sin interés, así como las esferas demasiado grandes o pequeñas. El paso final consiste en el cálculo de las propiedades de los aminoácidos de los bolsillos encontrados con el fin de ordenarlos en base a su mayor o menor capacidad para albergar un ligando. Algunas de estas propiedades son, por ejemplo, la densidad hidrófoba del bolsillo, la polaridad de los aminoácidos involucrados y el volumen total de la cavidad, entre otras. De este modo, el programa proporciona como resultado, a partir de las estructuras de PDB introducidas como archivos de entrada, un

¹⁴² Redondo, M.; Soteras, I.; Brea, J.; González-García, A.; Cadavid, M.I.; Loza, M.I.; Martínez, A.; Gil, C.; Campillo, N.E. "Unraveling phosphodiesterase surfaces. Identification of phosphodiesterase 7 allosteric modulation cavities" *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 781-788.

¹⁴³ Le Guilloux, V.; Schmidtke, P.; Tuffery, P. "Fpocket: An open source platform for ligand pocket detection" *BMC Bioinformatics* **2009**, *10*, 168-178.

listado de los diferentes bolsillos encontrados, numerados de 1 a n, siendo n el número de bolsillos encontrados y 1 el valor del bolsillo más adecuado para la unión de un ligando externo, que debe ser en todos los casos el correspondiente al sitio activo o sitio de unión conocido.

En nuestro caso, se tomaron las 15 estructuras disponibles en el PDB, en las cuales se eliminaron tanto las moléculas de agua de cristalización así como los ligandos orgánicos presentes, y se emplearon como archivos de entrada para el análisis por F-Pocket. Como resultado, el programa detectó hasta 15 bolsillos diferentes en las 15 estructuras analizadas. De todos los bolsillos encontrados, se seleccionaron los siete más conservados a lo largo de todas ellas (**figura 50**).

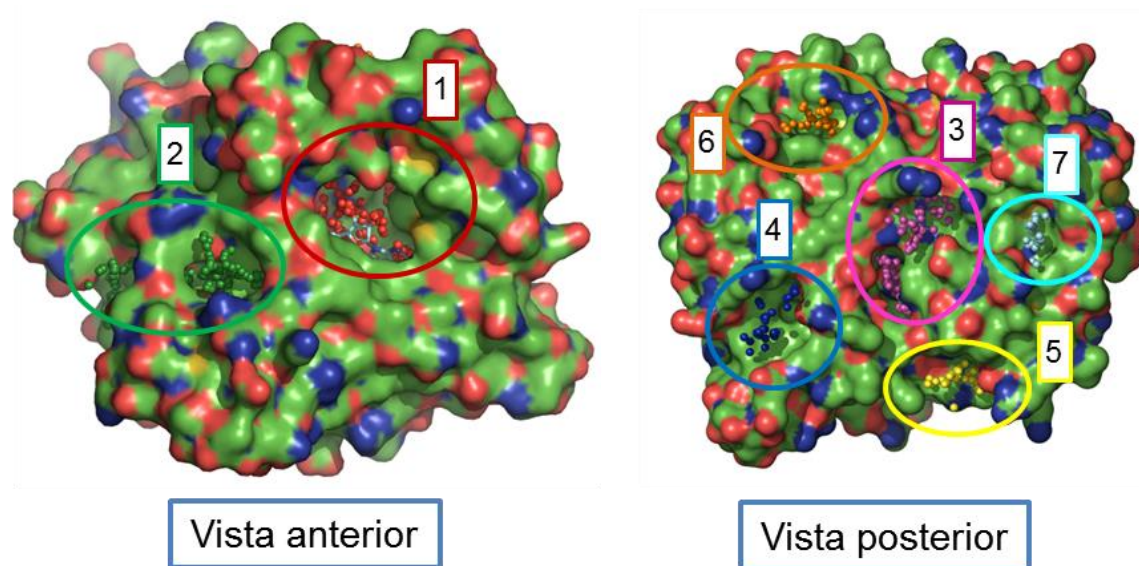


Figura 50. Representación de las cavidades más conservadas a lo largo de todas las estructuras de PDE10A analizadas por F-Pocket.

Estos siete bolsillos se ordenaron en función de la puntuación asignada por el programa, coincidiendo el bolsillo número 1 (color rojo) con el centro activo de la enzima, que como es lógico es el que tiene mayor puntuación en todas las estructuras analizadas (**tabla 20**). En los casos en los que aparecen dos números en la casilla de la tabla correspondiente se debe a que el programa detecta un mismo bolsillo como dos cavidades diferentes, pero cuando lo analizamos de manera visual y lo comparamos con el resto de estructuras, puede comprobarse que es la misma zona de la proteína y, por lo tanto, es un único bolsillo y no dos.

Tabla 20. Bolsillos más conservados en el análisis por F-Pocket y la puntuación relativa asignada para cada uno de ellos.

| PDB | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------|---|-----|-----|------|------|------|------|
| 2OUN | 1 | 3,4 | 2,6 | 7 | 14 | 11 | 9 |
| 2OUP | 1 | 3,6 | 2,5 | 4 | n.e. | n.e. | 8 |
| 2OUQ | 1 | 3,5 | 6,7 | 2 | 14 | 8 | 11 |
| 2WEY | 1 | 5 | 3,4 | 7 | 9 | 8 | 12 |
| 2Y0J | 1 | 4 | 2,5 | 3 | 9 | n.e. | n.e. |
| 3SN7 | 1 | 4,5 | 2,6 | 3 | n.e. | 8 | 11 |
| 3SNI | 1 | 3,5 | 2,4 | n.e. | 7 | 6 | n.e. |
| 3SNL | 1 | 5,6 | 2,3 | 7 | 13 | 12 | 8 |
| 3UI7 | 1 | 4,6 | 2,5 | 3 | 9 | n.e. | n.e. |
| 3UUO | 1 | 3,4 | 2 | 1 | 9 | n.e. | n.e. |
| 4AEL | 1 | 4,7 | 2,3 | n.e. | n.e. | 9 | 8 |
| 4DDL | 1 | 3,6 | 2 | 5 | 9 | n.d. | n.d. |
| 4DFF | 1 | 4,6 | 2 | n.e. | n.e. | n.e. | n.e. |
| 4FCB | 1 | 3 | 2,6 | n.e. | 5 | n.e. | n.e. |
| 4FCD | 1 | 4,5 | 2,7 | 3 | n.e. | n.e. | n.e. |

n.e. (bolsillo no encontrado).

A continuación, con el fin de confirmar que el bolsillo 1 coincidía con el sitio de unión del AMPc, se llevó a cabo la superposición de la estructura 2OUN (que es la que se encuentra cristalizada con AMPc) con el bolsillo 1 detectado por F-Pocket, mostrando claramente como las esferas de color rojo se sitúan en la zona donde está el AMPc en la enzima (**figura 51**).

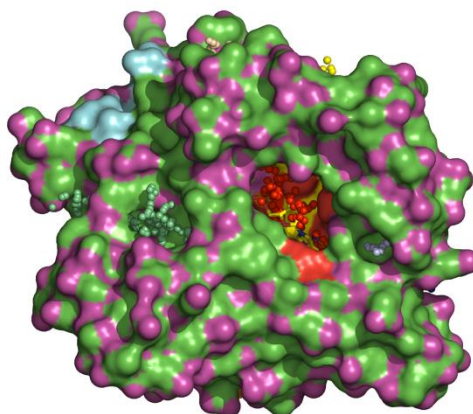


Figura 51. Superposición de la estructura del AMPc (amarillo) en el cristal de PDE10A con el bolsillo detectado como número 1 por F-Pocket (esferas rojas).

Una vez realizado el análisis con F-Pocket de la superficie del dominio catalítico de PDE10A, decidimos comparar estos resultados con los obtenidos para este mismo análisis realizado previamente en nuestro grupo con PDE7A (**figura 52**).

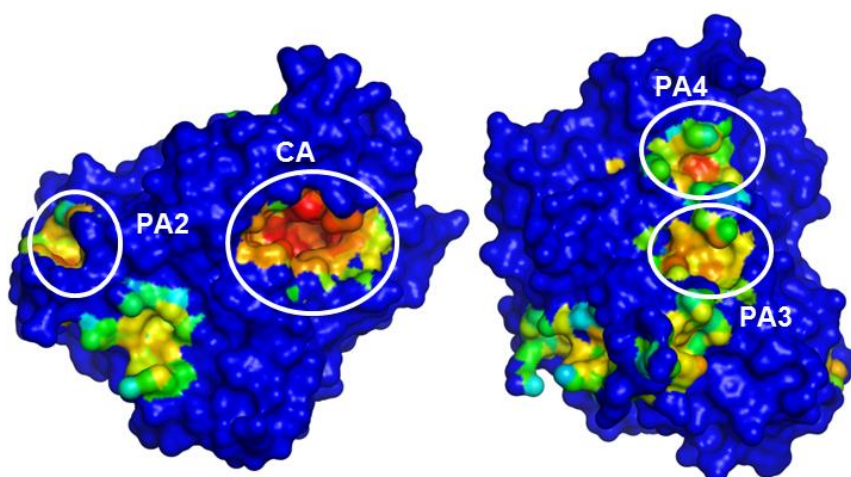


Figura 52. Cavidades encontradas en PDE7A (código PDB: 1ZKL) mediante análisis por F-Pocket¹⁴².

Como dato más relevante, cabe destacar que el bolsillo número 3 (color magenta) detectado en la mayoría de las estructuras de PDE10A analizadas como el bolsillo con mayor puntuación después del sitio activo, coincidía con el bolsillo denominado PA3 en el caso de la enzima PDE7A, por lo que la posible unión de ligandos a esta cavidad en la superficie de la proteína no daría lugar, en principio, a inhibidores selectivos de una fosfodiesterasa frente a la otra.

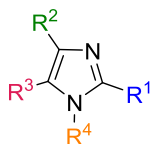
Otro elemento interesante fue que otra de las cavidades descritas para PDE7A, la denominada PA2, no fue detectada por el programa en ninguna de las estructuras de PDE10A con una puntuación relevante, puesto que en este caso la diferencia en la secuencia de aminoácidos entre una fosfodiesterasa y la otra hace que en PDE10A esa zona no represente una cavidad con unas propiedades adecuadas para albergar un ligando según este programa. Este dato nos aporta una explicación teórica para los datos experimentales de inhibición obtenidos para los derivados de tioxoquinazolina sin alquilar (**tabla 19**): estos inhibidores mixtos de PDE7A, pueden inhibir la enzima por unión al sitio catalítico así como al bolsillo alostérico descrito denominado PA2¹⁴²; la ausencia de actividad o la notable disminución de la potencia de inhibición de estos derivados frente a PDE10A en comparación con PDE7A puede explicarse debido a la ausencia de este sitio de unión alostérico en la superficie de PDE10A.

Por tanto, podemos concluir que las tioxoquinazolinas S-alquiladas pueden, en su mayoría, inhibir tanto PDE7A como PDE10A, dado que son inhibidores competitivos con AMPc y por tanto se unen al sitio activo de las mismas. Sin embargo, las tioxoquinazolinas no alquiladas son inhibidores mixtos de PDE7A, uniéndose tanto al sitio activo como a un bolsillo alostérico de la superficie de la enzima. Este último está presente solamente en PDE7A frente a PDE10A, lo que explicaría la selectividad de estos derivados como inhibidores de PDE7A frente a la enzima PDE10A.

2.2.2. Desarrollo de nuevos derivados de imidazol a partir de los cabezas de serie identificados

Puesto que los tres derivados de imidazol (**Im1**, **Im9** e **Im38**) de la **figura 48** fueron identificados en el cribado virtual como inhibidores de PDE10A, se decidió evaluar todos los compuestos presentes en nuestra quimioteca pertenecientes a esta familia química. Todos ellos se ensayaron inicialmente a una concentración de 10 μ M y cuando el porcentaje de inhibición a dicha concentración superaba el 50%, se determinó la curva dosis-respuesta que permitió calcular la CI_{50} . Como control de este ensayo se utilizó el inhibidor comercial de PDE10A **Papaverina** (**tabla 21**).

Tabla 21. Imidazoles de nuestra quimioteca y sus actividades en PDE10A. Los porcentajes de inhibición se calcularon inicialmente a una concentración de 10 μ M.




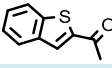
| Compuesto | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ | % inh @10 μ M | Cl ₅₀ (μ M) |
|------------|---|----------------|----------------|--------------------|----------------------|--------------------------------|
| Papaverina | | | | | | 0.02 |
| Im1 | 2-OMe-Ph | 4-Br-Ph | 4-Br-Ph | H | 90.9 | 0.40 |
| Im2 | 2-Cl-Ph | 4-Br-Ph | 4-Br-Ph | H | 97.7 | 0.16 |
| Im3 | 2-OMePh | 4-Br-Ph | 4-Br-Ph | CH ₂ Ph | 31.3 | - |
| Im4 | 2-ClPh | 4-Br-Ph | 4-Br-Ph | CH ₂ Ph | 39.7 | - |
| Im5 | 2-OMe-Ph | 4-OMe-Ph | 4-OMe-Ph | H | 93.9 | 5.41 |
| Im6 | 2-Cl-Ph | 4-OMe-Ph | 4-OMe-Ph | H | 98.0 | 1.33 |
| Im7 | 2-OMe-Ph | 4-OMe-Ph | 4-OMe-Ph | CH ₂ Ph | 26.1 | - |
| Im8 | 2-Cl-Ph | 4-OMe-Ph | 4-OMe-Ph | CH ₂ Ph | 44.0 | - |
| Im9 | Ph | 4-Br-Ph | H | H | 61.5 | 1.48 |
| Im10 | 2-Pyr | 4-Br-Ph | H | H | 38.8 | - |
| Im11 | 3,5-CF ₃ -Ph | 4-Br-Ph | H | H | 74.3 | 2.47 |
| Im12 | Ph | 4-Cl-Ph | H | H | 75.4 | 2.78 |
| Im13 | 4-Cl-Ph | 4-Cl-Ph | H | H | 72.8 | 5.29 |
| Im14 | Ph | 4-Cl-Ph | H | CH ₂ Ph | 25.4 | - |
| Im15 | 3,5-CF ₃ -Ph | 4-OMe-Ph | H | H | 95.1 | 0.36 |
| Im16 | 3,5-CF ₃ -Ph | 4-Br-Ph | H | H | 74.3 | 2.47 |
| Im17 | Ph | Ph | H | H | 30.5 | - |
| Im18 | 2,4,5-OMe-Ph | Ph | H | H | 94.5 | 1.24 |
| Im19 | 2,4-OMe-Ph | Ph | H | H | 50.2 | 7.00 |
| Im20 | 2,5-OMe-Ph | Ph | H | H | 51.4 | 3.67 |
| Im21 | 2-OMe-Ph | Ph | H | H | 73.7 | 34.18 |
| Im22 | 3-Me-Ph | Ph | H | H | 42.9 | - |
| Im23 | 4-F-Ph | Ph | H | H | 22.2 | - |
| Im24 | 4-Me-Ph | Ph | H | H | 18.2 | - |
| Im25 | 2-Cl-Ph | Ph | H | H | 1.9 | - |
| Im26 | 3-Me-Ph | Ph | H | CH ₂ Ph | 54.8 | 2.58 |
| Im27 | 4-Me-Ph | Ph | H | CH ₂ Ph | 52.0 | 2.84 |
| Im28 | 2,4,5-OMe-Ph | Ph | H | CH ₂ Ph | 95.9 | 4.43 |
| Im29 | 2,5-OMe-Ph | Ph | H | CH ₂ Ph | 38.8 | - |
| Im30 | 2-Cl-Ph | Ph | H | CH ₂ Ph | 1.9 | - |
| Im31 | Ph | 2-naftilo | H | H | 47.7 | 3.87 |
| Im32 | Ph | 4-OMe-Ph | H | H | 64.1 | 4.82 |
| Im33 | 4-Cl-Ph | 4-OMe-Ph | H | H | 82.2 | 1.96 |
| Im34 |  | 4-Br-Ph | H | H | 48.2 | 1.42 |

Tabla 21 (continuación).

| Compuesto | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ | % inh @10 μ M | Cl ₅₀ (μ M) |
|-------------|----------------|----------------|----------------|--|----------------------|--------------------------------|
| Im35 | H | 4-Br-Ph | 4-Br-Ph | H | 88.8 | 0.17 |
| Im36 | H | 4-OMe-Ph | 4-OMe-Ph | H | 56.1 | 5.36 |
| Im37 | H | Ph | Ph | H | 29.1 | - |
| Im38 | H | Ph | Ph | Et | 76.0 | 3.09 |
| Im39 | H | Ph | Ph | Bu | 29.0 | - |
| Im40 | H | Ph | Ph | CH ₂ -4-CF ₃ -Ph | 19.7 | - |
| Im41 | H | Ph | Ph | CH ₂ -CH ₂ -Ph | 18.2 | - |
| Im42 | H | Ph | Ph | CH ₂ -2-Cl-Ph | 18.2 | - |
| Im43 | H | Ph | Ph | CH ₂ Ph | 16.6 | - |
| Im44 | H | Ph | Ph | CH ₂ -biPh | 14.5 | - |
| Im45 | H | Ph | Ph | ⁱ Bu | 12.8 | - |
| Im46 | H | Ph | Ph | CH ₂ -4Pyr | 9.6 | - |
| Im47 | H | Ph | Ph | CH ₂ -3-Cl-Ph | 7.1 | - |
| Im48 | H | Ph | Ph |  | 31.9 | - |
| Im49 | H | Ph | Ph | CH ₂ -4-SMe-Ph | 5.3 | - |
| Im50 | H | Ph | Ph | CO-Ph | 1.9 | - |
| Im51 | H | Ph | Ph | CH ₂ -3,5-CF ₃ -Ph | 27.7 | - |

Como puede verse en la **tabla 21**, muchos de los derivados evaluados mostraron inhibición en PDE10A en el rango micromolar. Las primeras relaciones estructura-actividad mostraron que los imidazoles trisustituídos (**Im1**, **Im2**, **Im5**, **Im6**) eran los que presentaban, en general, mejores valores de Cl₅₀. Sin embargo, la actividad se perdía con la sustitución en el nitrógeno 1 del anillo (R⁴ ≠ H) (compuestos **Im3**, **Im4**, **Im7**, **Im8** frente a **Im1**, **Im2**, **Im5**, **Im6**).

Además, en el grupo de los imidazoles 4,5-disustituídos, el compuesto identificado como prototipo en el cribado virtual **Im38**, en el que el sustituyente en el nitrógeno era un grupo alquilo, era moderadamente activo, mientras que de manera general la presencia de sustituyentes más voluminosos (**Im39-Im51**) también hacía que la actividad se perdiese, al igual que en los trisustituídos.

Por otro lado, cabe citar la amplia variabilidad de actividades encontrada en cuanto a los derivados 2,4-disustituídos (**Im9-Im34**), lo que unido a la presencia de los dos tautómeros correspondientes a la diferente posición del protón en cada uno de los dos nitrógenos del imidazol, hizo bastante difícil racionalizar el modo de unión de una forma adecuada para el diseño de nuevos inhibidores con este tipo de sustitución.

Con el fin de intentar optimizar la actividad biológica de esta familia de inhibidores de PDE10A, se llevaron a cabo estudios teóricos del modo de unión focalizados en el sitio activo.

2.2.2.1. Imidazoles 2,4,5-trisustituídos: estudio del modo de unión, síntesis de nuevos derivados y evaluación enzimática

Puesto que tanto el imidazol trisustituído identificado **Im1** como los evaluados posteriormente (**Im2**, **Im5** e **Im6**, **tabla 21**) tenían una buena potencia inhibitoria, decidimos estudiar detalladamente el modo de unión de estos compuestos con la enzima con el fin de diseñar nuevos compuestos a sintetizar.

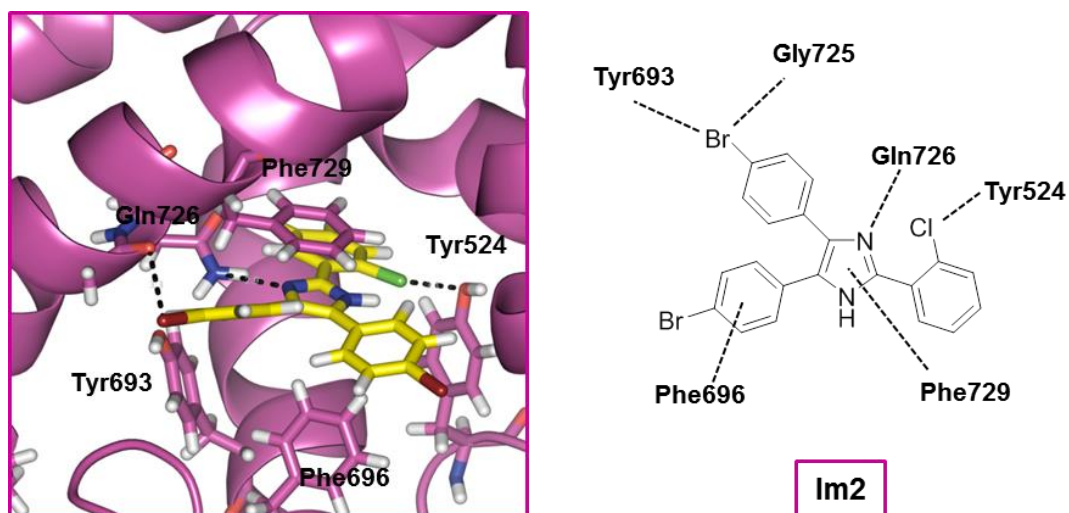


Figura 53. Modo de unión del compuesto **Im2** en el centro activo de PDE10A.

El derivado **Im2** es uno de los inhibidores de PDE10A más potentes. Respecto al modo de unión de este compuesto con la enzima, cabe destacar que el anillo de imidazol presenta un solapamiento π - π con la Phe729 del sitio catalítico, a la vez que el átomo de nitrógeno en posición 3 de dicho anillo establece un enlace de hidrógeno con el grupo amino de la Gln726, actuando éste como dador en esta interacción, mientras que el nitrógeno del imidazol se comportaría como aceptor (**figura 53**). De hecho, tal y como se ha explicado en la introducción de este trabajo, en PDE10A la Gln726 no tiene libertad de giro, estando su conformación “fijada” por la interacción directa con la Tyr693^{21,22}, y la interacción mediada por moléculas de agua con Tyr730 y Trp762. Por otro lado, cabe destacar que el anillo 4-bromosustituído de la posición 4 (R^2) se orienta hacia la zona donde se encuentra la Tyr693, estableciéndose en ese caso una interacción del bromo con los grupos carbonilo de Gly715 e hidroxilo de Tyr693, conocida como puente de

halógeno por su similitud con el enlace de hidrógeno. Un enlace halógeno puede referirse a una interacción entre un grupo carbonilo, hidroxilo, tiol, anillo aromático, carboxilato, fosfato o amina, y un halógeno (F, Cl, Br, I), donde la distancia entre el donador y el aceptor en este enlace es menor o igual que la suma de los radios de van der Waals¹⁴⁴. Este tipo de interacción se debe a que la presencia de los tres pares de electrones libres que tienen los halógenos hace que se genere una zona de carga negativa alrededor de dicho átomo, dejando la región un poco más alejada del núcleo con una carga parcialmente positiva¹⁴⁵. El hecho de que el resto de fosfodiesterasas posea otros aminoácidos con cadenas laterales más voluminosas (Ile, Met, Ser, Leu) que la de Gly715 presente en PDE10A, junto con la presencia única en PDE10A de la Tyr693, hace que la posibilidad de interacción en esta zona del sitio de unión sea única en esta fosfodiesterasa. De hecho, todos los imidazoles de nuestra colección de compuestos con un sustituyente 4-bromofenilo mostraron actividad en PDE10A. En cuanto al anillo aromático de la posición 5 del anillo de imidazol (R^3), presenta una interacción aromática con la Phe696. Además de estas interacciones, en el caso del derivado **Im2**, el átomo de Cl presente en la posición 2 del anillo aromático en la posición 2 del imidazol (R^1) interacciona con el grupo hidroxilo del anillo de la Tyr524 de nuevo mediante un enlace tipo halógeno. Este modo de unión se mantiene para todos los derivados trisustituídos (**Im1**, **Im2**, **Im5**, **Im6**, figura 54).

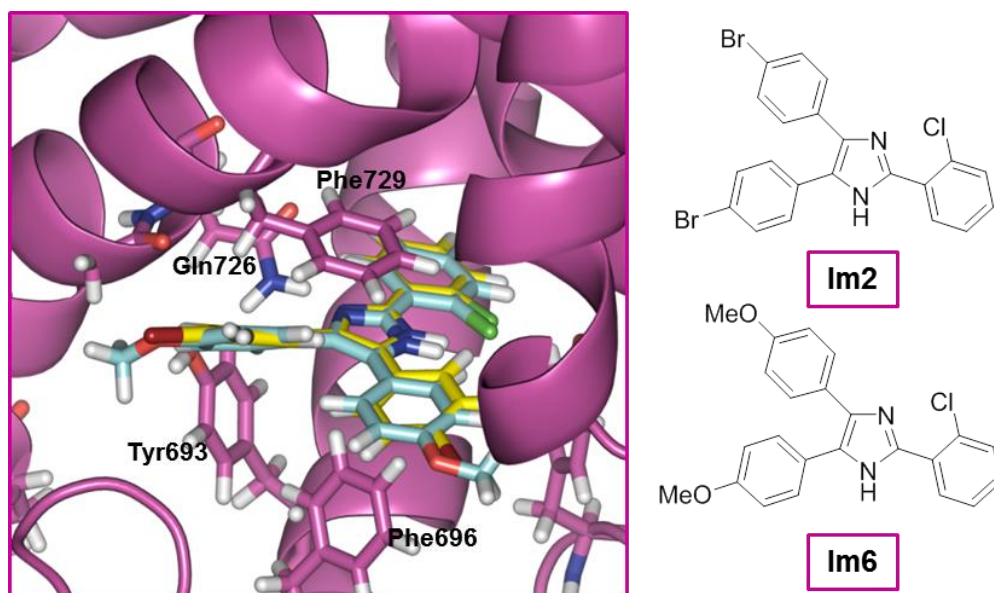


Figura 54. Superposición de los compuestos **Im2** (amarillo) e **Im6** (azul) en el centro activo de la enzima PDE10A.

¹⁴⁴ Sirimulla, S.; Bailey, J.B.; Vegesna, R.; Narayan, M. "Halogen interactions in protein-ligand complexes: implications of halogen bonding for rational drug design" *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, 53, 2781-2791.

¹⁴⁵ Clark, T.; Hennemann, M.; Murray, J.S.; Politzer, P. "Halogen bonding: the σ -hole" *J. Mol. Model.* **2007**, 13, 291-296.

A partir de este modo de unión, y teniendo en cuenta la disponibilidad comercial de los reactivos necesarios para la síntesis de estos derivados, se diseñaron nuevos derivados de imidazol 2,4,5-trisustituídos, en los que se mantenían los mismos sustituyentes en las posiciones 4 y 5 del anillo de imidazol (R^2 y R^3), pero variando en este caso la sustitución del anillo en la posición 2 (R^1). Los sustituyentes seleccionados para el anillo aromático de ésta última posición incluyeron tanto halógenos como el grupo metoxilo, que permitiesen la interacción con la Tyr524. Se sintetizaron además 3- y 4-cloro sustituidos para estudiar la influencia de ese cambio de posición en la actividad. Las diferentes sustituciones propuestas se muestran en la **figura 55**.

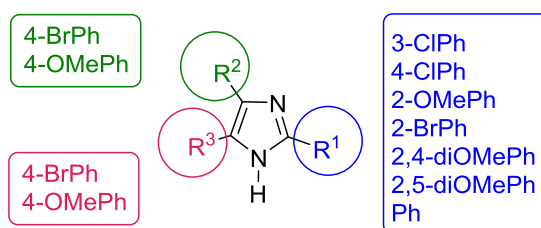
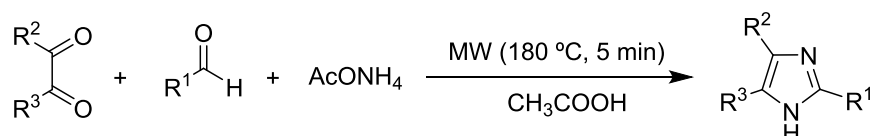


Figura 55. Derivados de imidazol 2,4,5-trisustituídos propuestos.

Los derivados de imidazol 2,4,5-trisustituídos (**94-101**) se sintetizaron mediante la ciclación de la correspondiente 1,2-dicetona con diferentes aldehídos, en presencia de un exceso de acetato de amonio¹⁴⁶. Las reacciones de ciclación se llevaron a cabo bajo irradiación microondas durante 5 minutos a una temperatura de 180 °C (**esquema 14**).



| Compuesto | R^1 | R^2 | R^3 | Rto. (%) |
|------------|-------------|---------|---------|----------|
| 94 | 3-ClPh | 4-BrPh | 4-BrPh | 73 |
| 95 | 4-ClPh | 4-BrPh | 4-BrPh | 40 |
| 96 | 2-BrPh | 4-BrPh | 4-BrPh | 70 |
| 97 | Ph | 4-BrPh | 4-BrPh | 75 |
| 98 | 2,4-diOMePh | 4-BrPh | 4-BrPh | 78 |
| 99 | 2,5-diOMePh | 4-BrPh | 4-BrPh | 59 |
| 100 | 2-BrPh | 4-OMePh | 4-OMePh | 70 |
| 101 | Ph | 4-OMePh | 4-OMePh | 83 |

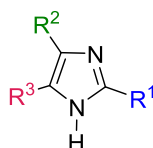
Esquema 14. Síntesis de imidazoles 2,4,5-trisustituídos (**94-101**).

¹⁴⁶ Wolkenberg, S.E.; Wisnoski, D.D.; Leister, W.H.; Wang, Y.; Zhao, Z.; Lindsley, C.W. "Efficient synthesis of imidazoles from aldehydes and 1,2-diketones using microwave irradiation" *Org. Lett.* **2004**, 6, 1453-1456.

Todos los productos obtenidos se aislaron y purificaron, y fueron caracterizados mediante las técnicas analíticas y espectroscópicas adecuadas, tal y como se muestra en la parte experimental.

A continuación, los nuevos derivados de imidazol (**94-101**) fueron evaluados en la enzima PDE10A empleando la misma metodología que se ha citado anteriormente (**tabla 22**). Se incluyen también los datos de actividad de los compuestos **Im1** e **Im2** como compuestos de referencia. Es de mencionar que el compuesto **Im0.1**, que corresponde al imidazol trisustituido con anillos de fenilo sin sustitución, comercialmente disponible, tan solo presenta un 27% de inhibición a una concentración de 10 μM .

Tabla 22. Evaluación enzimática en PDE10A de los derivados de imidazol 2,4,5-trisustituidos sintetizados.



| Compuesto | R ¹ | R ² | R ³ | CI ₅₀ (μM) |
|--------------|----------------|----------------|----------------|---------------------------------------|
| Im0.1 | Ph | Ph | Ph | - |
| Im1 | 2-OMe-Ph | 4-Br-Ph | 4-Br-Ph | 0.40 |
| Im2 | 2-Cl-Ph | 4-Br-Ph | 4-Br-Ph | 0.16 |
| 94 | 3-Cl-Ph | 4-Br-Ph | 4-Br-Ph | n.d. |
| 95 | 4-Cl-Ph | 4-Br-Ph | 4-Br-Ph | n.d. |
| 96 | 2-Br-Ph | 4-Br-Ph | 4-Br-Ph | 0.44 |
| 97 | Ph | 4-Br-Ph | 4-Br-Ph | n.d. |
| 98 | 2,4-OMe-Ph | 4-Br-Ph | 4-Br-Ph | n.d. |
| 99 | 2,5-OMe-Ph | 4-Br-Ph | 4-Br-Ph | n.d. |
| 100 | 2-BrPh | 4-OMe-Ph | 4-OMe-Ph | 2.17 |
| 101 | Ph | 4-OMe-Ph | 4-OMe-Ph | 0.37 |

n.d. (el compuesto precipita en el medio del ensayo y no puede ser evaluado).

En primer lugar, cabe destacar que la mayoría de los nuevos derivados sintetizados no pudieron ser evaluados debido a que precipitaban en las condiciones empleadas en el ensayo (**94, 95, 97-99**), por lo que no se pudo estudiar la influencia de algunas de las nuevas sustituciones en el anillo en posición 2 del imidazol. En cuanto a los compuestos que pudieron ser evaluados, cabe destacar que la ausencia de sustitución o la presencia de sustituyente en la posición 2 del anillo aromático situado en la posición 2 del imidazol (R¹) proporciona compuestos activos, lo cual confirmaría el modo de unión teórico propuesto, donde dicho sustituyente presenta interacción con la Tyr524.

A continuación, y puesto que según el modo de unión propuesto el protón del nitrógeno del imidazol no presenta ninguna interacción importante con los aminoácidos del centro activo de la enzima, se decidió alquilar ese nitrógeno y así corroborar nuestra hipótesis. Basándonos en los datos de inhibición obtenidos para los diferentes imidazoles *N*-alquilados de nuestra quimioteca (**Im1-Im51**), decidimos introducir como sustituyentes grupos alquílicos pequeños tales como metilo y etilo, ya que otros grupos más voluminosos como bencilo, provocaban la pérdida de la actividad biológica (**Im3**, **Im4**, **Im7**, **Im8**). Se propusieron como nuevos compuestos a sintetizar los derivados *N*-alquilados del imidazol trisustituido más sencillo ($R^1 = R^2 = R^3 = \text{Ph}$), así como los de otros imidazoles sintetizados previamente (**figura 56**).

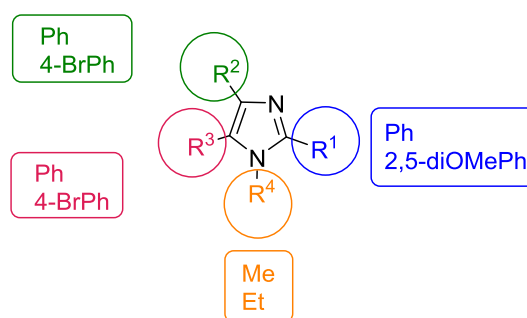
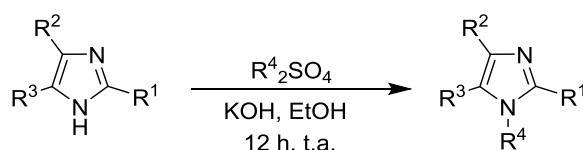


Figura 56. Derivados de imidazol *N*-alquilados propuestos.

La alquilación de los derivados de imidazol trisustituidos se llevó a cabo empleando hidróxido de potasio en etanol, utilizando como agente alquilante el correspondiente sulfato de dialquilo. Tras 12 horas de agitación a temperatura ambiente, se aislaron los derivados de imidazol *N*-alquilados (**102-105**, **esquema 15**) y se caracterizaron empleando las técnicas analíticas y espectroscópicas adecuadas, tal y como se encuentra detallado en la parte experimental.

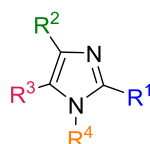


| Compuesto | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ | Rto. (%) |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------|
| 102 | Ph | Ph | Ph | Me | 40 |
| 103 | Ph | Ph | Ph | Et | 56 |
| 104 | 2,5-diOMePh | 4-BrPh | 4-BrPh | Et | 60 |
| 105 | Ph | 4-BrPh | 4-BrPh | Et | 42 |

Esquema 15. Imidazoles 2,4,5-trisustituidos *N*-alquilados **102-105**.

A continuación fueron evaluados en la enzima PDE10A de la misma manera que los imidazoles anteriores. Los datos de actividad para cada uno de los derivados, expresados en porcentaje de inhibición a una concentración de 10 μM y de CI_{50} , se muestran en la **tabla 23**.

Tabla 23. Evaluación enzimática en PDE10A de los derivados de imidazol 2,4,5-trisustituídos *N*-alquilados sintetizados.



| Compuesto | R ¹ | R ² | R ³ | R ⁴ | % inh @10 μM | CI ₅₀ (μM) |
|------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------------|------------------------------------|
| 102 | Ph | Ph | Ph | Me | 62.3 | 4.10 |
| 103 | Ph | Ph | Ph | Et | 67.4 | 2.00 |
| 104 | 2,5-diOMePh | 4-Br-Ph | 4-Br-Ph | Et | 69.4 | 0.32 |
| 105 | Ph | 4-Br-Ph | 4-Br-Ph | Et | 49.8 | 1.30 |

Tal y como muestran estos resultados, los derivados *N*-alquilados con restos alifáticos pequeños tales como metilo y etilo son activos, lo cual corrobora que la interacción con la Gln726 es a través del nitrógeno aceptor del imidazol, y no del grupo NH del heterociclo. En la zona donde se orientan estos grupos alquilo tenemos, además, un entorno hidrofóbico formado por aminoácidos como Leu665, Leu625 e Ile692 favoreciéndose la interacción de estos grupos alquilo con la enzima (**figura 57**).

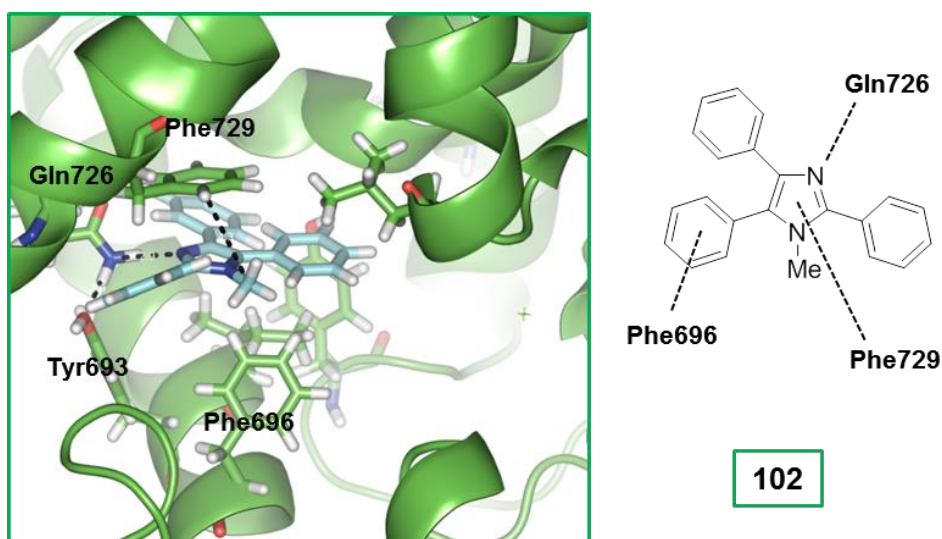


Figura 57. Modo de unión del derivado de imidazol *N*-alquilado **102** en el centro activo de PDE10A.

2.2.2.2. Imidazoles 4,5-disustituídos: estudio del modo de unión, síntesis de nuevos derivados y su evaluación enzimática

Puesto que uno de los prototipos identificados mediante el cribado virtual, el derivado **Im38**, pertenece al grupo de los imidazoles 4,5-disustituídos, se decidió estudiar el modo de unión de este y otros compuestos con el mismo tipo de disustitución de manera más detallada.

Los imidazoles con sustituyentes 4-bromofenilo y 4-metoxifenilo en las posiciones 4 y 5 del heterociclo (R^2 y R^3) (compuestos **Im35** e **Im36**), muestran en su modo de unión un enlace de hidrógeno con la Tyr524 en vez de con la Gln726 de los casos anteriores, y además éste se formaba a través del grupo NH del heterociclo, que actúa ahora como elemento dador de dicho enlace. Cabe destacar, además, que el anillo en la posición 4 del imidazol presenta interacción π - π con la Phe729 e interacción *T-shape* con la Phe696 del sitio activo al mismo tiempo. Más en concreto, en el derivado **Im35** se forma un puente de halógeno entre el átomo de bromo presente en el anillo aromático de la posición 4 del imidazol y los grupos hidroxilo de la Tyr693 y amino de la Gln726, formándose de este modo una red de enlaces (**figura 58**); mientras que en el derivado **Im36**, el grupo metoxilo interacciona por enlace de hidrógeno con dichos aminoácidos. Estas últimas interacciones justifican la mayor actividad de los derivados 4-fenil sustituidos.

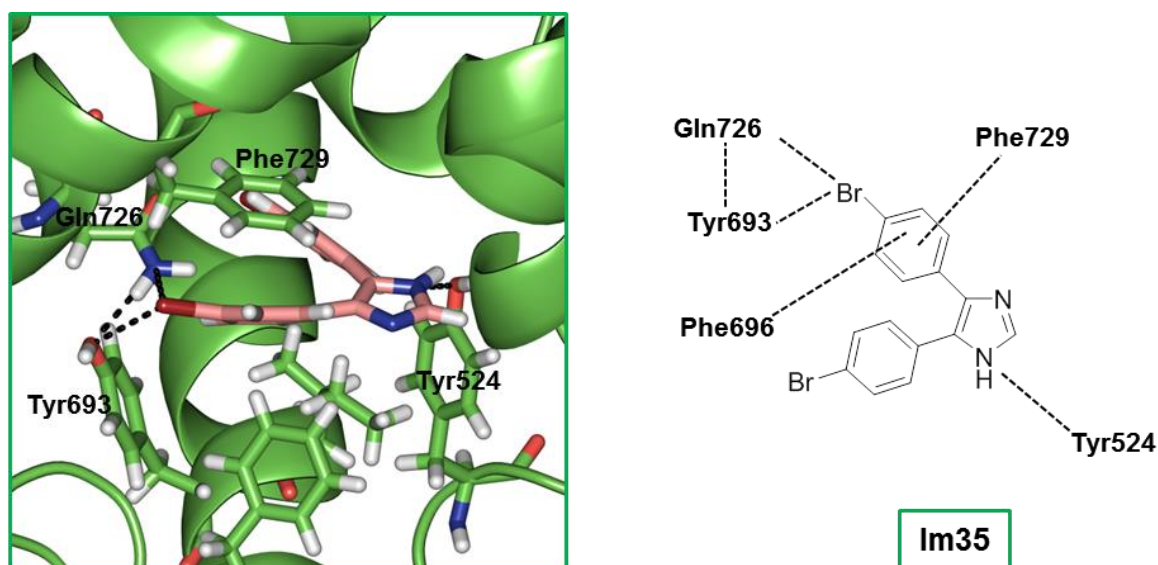


Figura 58. Modo de unión del derivado **Im35** en el centro activo de PDE10A.

Por otro lado, dada la presencia de actividad inhibitoria en el derivado identificado como prototipo **Im38**, el cual según el modo de unión de la **figura 58** no sería activo porque el enlace de hidrógeno con la Tyr524 desaparece, decidimos estudiar de manera

teórica el modo de unión de este derivado, así como el de su análogo metilado. Tal y como se muestra en la **figura 59**, la introducción de un grupo metilo o etilo en el nitrógeno libre del anillo de imidazol hace que el compuesto pase de formar un enlace de hidrógeno con la Tyr524 a formarlo con la Gln726, además de la presencia de una interacción π - π con la Phe729, presentando estos dos anillos un buen solapamiento para dicha interacción. El nitrógeno donde están presentes los grupos metilo y etilo se orienta ahora hacia la misma zona hidrofóbica que lo hace en el caso de los derivados de imidazol trisustituídos ya mencionados (Leu665, Leu625 e Ile682). Es decir, en vez de perder la actividad debido a la alquilación del nitrógeno del anillo de imidazol, el inhibidor adopta un modo de unión similar al de los imidazoles trisustituídos *N*-alquilados anteriormente descritos (**102-105**), estableciendo nuevas interacciones con la enzima que hacen que sigan mostrando una buena potencia de inhibición.

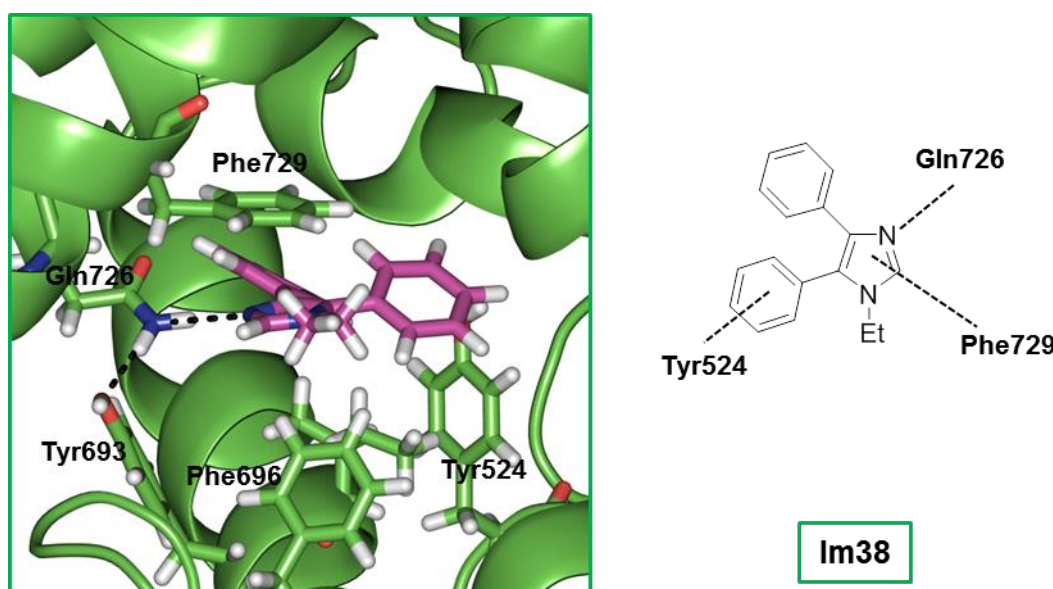
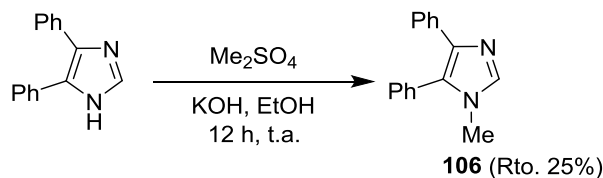


Figura 59. Modo de unión del derivado **Im41** en el centro activo de PDE10A.

Además, este modo de unión confirma los datos de actividad obtenidos en los derivados *N*-bencilados, puesto que la presencia de este grupo más voluminoso hace que no sea posible establecer el modo de unión encontrado para los derivados con grupos alquílicos pequeños (**Im38**).

Puesto que el derivado *N*-metilado no había sido ensayado de manera experimental en la enzima, se llevó a cabo la síntesis de dicho imidazol mediante alquilación del 4,5-difenilimidazol, utilizando las mismas condiciones de reacción que para la alquilación de los derivados de imidazol trisustituídos (**102-105**), obteniéndose así el imidazol **106** (**esquema 16**). Este derivado fue evaluado como inhibidor de PDE10A, obteniéndose un

porcentaje de inhibición del 57.4% a una concentración 10 μ M de compuesto, por lo que calculó a continuación la curva dosis-respuesta y se determinó la CI_{50} , cuyo valor fue 5.6 μ M.



Esquema 16. Síntesis del imidazol *N*-metilado **106**.

2.2.2.3. Predicción del paso de barrera hematoencefálica

A continuación, se evaluó el paso de barrera hematoencefálica de los nuevos inhibidores de PDE10A utilizando la metodología PAMPA.

A partir de la representación de los valores experimentales frente a los valores teóricos descritos de permeabilidad efectiva de los controles, se obtuvo la recta de correlación $y = 1.4252x - 1.2162$ ($R^2 = 0.9842$). Con esta recta de calibrado y siguiendo la metodología descrita¹¹⁵, se pudo concluir que los compuestos **100**, **101**, **102**, **105** y **106** serían capaces de atravesar la barrera hematoencefálica mediante difusión pasiva (**tabla 24**), y por lo tanto, podrían ser considerados buenos candidatos para el tratamiento de enfermedades del SNC ya que podrían llegar al cerebro y actuar sobre la enzima PDE10A. Cabe citar, por otro lado, que el compuesto **94** no se pudo evaluar puesto que precipitaba en las condiciones del ensayo, que **103** se encontraba en el límite de detección del método, y no se puede afirmar con certeza si sería o no capaz de atravesar la barrera; y finalmente, **104** resultó no ser capaz de atravesarla según este experimento. Por otro lado también es importante destacar que los derivados de imidazol pertenecientes a nuestra quimioteca que han sido citados aquí son, en su mayoría, permeables a la BHE¹⁴⁷.

¹⁴⁷ García Salado, M.I. "Nuevos inhibidores de proteínas quinasas como tratamiento innovador para enfermedades neurodegenerativas", tesis doctoral Universidad Complutense de Madrid **2014**.

Tabla 24. Datos obtenidos del ensayo PAMPA-BHE ($Pe \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) para los derivados de imidazol seleccionados.

| Compuesto | Pe experimental | Pe bibliografía | PAMPA-BHE |
|---------------------------|-------------------|-------------------|-----------|
| Atenolol | 0.4 ± 0.1 | 0.8 | |
| Cafeína | 1.0 ± 0.4 | 1.3 | |
| Desipramino | 15.8 ± 0.5 | 12 | |
| Enoxacino | 0.2 ± 0.1 | 0.9 | |
| Hidrocloruro de clonidina | 0.8 ± 0.1 | 1.9 | |
| Ofloxacino | 0.1 ± 0.1 | 0.8 | |
| Piroxicam | 0.6 ± 0.1 | 2.5 | |
| Promazina | 13.7 ± 0.8 | 8.8 | |
| Testosterona | 23.7 ± 0.1 | 17 | |
| Verapamilo | 19.9 ± 0.1 | 16 | |
| 96 | n.d. | | ppita |
| 100 | 12.3 ± 0.5 | | SNC+ |
| 101 | 20.0 ± 0.5 | | SNC+ |
| 102 | 10.6 ± 3.7 | | SNC+ |
| 103 | 3.7 ± 0.3 | | SNC+/SNC- |
| 104 | 0.4 ± 0.1 | | SNC- |
| 105 | 9.3 ± 0.8 | | SNC+ |
| 106 | 23.7 ± 0.7 | | SNC+ |

2.2.2.4. Evaluación de los nuevos derivados de imidazol en un modelo *in vitro* de la enfermedad de Parkinson

Con el fin de estudiar si PDE10 puede ser una buena diana terapéutica para un posible tratamiento de la enfermedad de Parkinson, se evaluaron los inhibidores de PDE10 de la familia de imidazoles en la línea celular SH-SY5Y, previamente dañada con 6-OHDA, determinándose la supervivencia celular mediante un ensayo con MTT (**figura 60**). Este ensayo fue llevado a cabo en colaboración con el grupo de la Profesora Ana Pérez Castillo (IIB-CSIC).

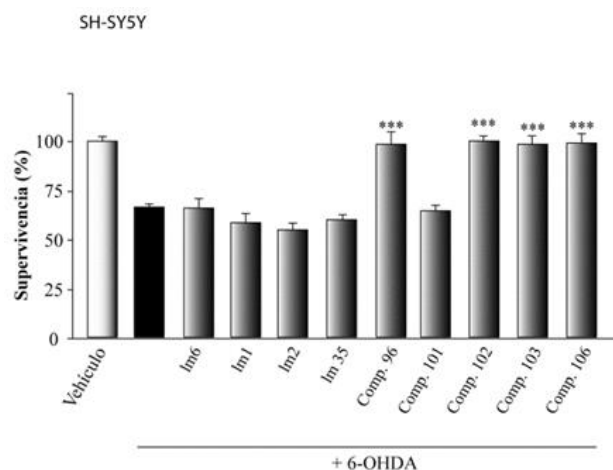


Figura 60. Medida de la supervivencia celular en células de la línea SH-SY5Y expuestas a 6-OHDA en presencia o ausencia de los inhibidores de PDE10A de la familia de los imidazoles.

De todos los derivados de imidazol seleccionados, se observa como los compuestos **96, 102, 103 y 106** protegen a las neuronas de la muerte inducida por 6-OHDA. La falta de eficacia observada en otros compuestos puede ser debida a diferentes problemas asociados tanto con solubilidad en el medio de cultivo como con la permeabilidad a la membrana celular.

2.2.2.5. Evaluación *in vitro* de la actividad antiinflamatoria de los nuevos inhibidores de PDE10A

Dada la existencia de un proceso inflamatorio que subyace a la muerte neuronal observada en la enfermedad de Parkinson, se decidió evaluar este efecto en los inhibidores de PDE10A. Para ello, se emplearon cultivos primarios de microglía y astrogía, que fueron tratadas con estos inhibidores y posteriormente con LPS, midiéndose así la capacidad de dichos derivados para proteger a las células frente al proceso inflamatorio empleando la reacción de Griess. Este ensayo fue llevado a cabo en colaboración con el grupo de la Profesora Ana Pérez Castillo (IIB-CSIC) (**figura 61**). Los resultados de este experimento muestran que los derivados de imidazol **Im2, Im6, 96, 102, 103 y 106** son capaces de proteger frente al daño inflamatorio inducido por el tratamiento con LPS.

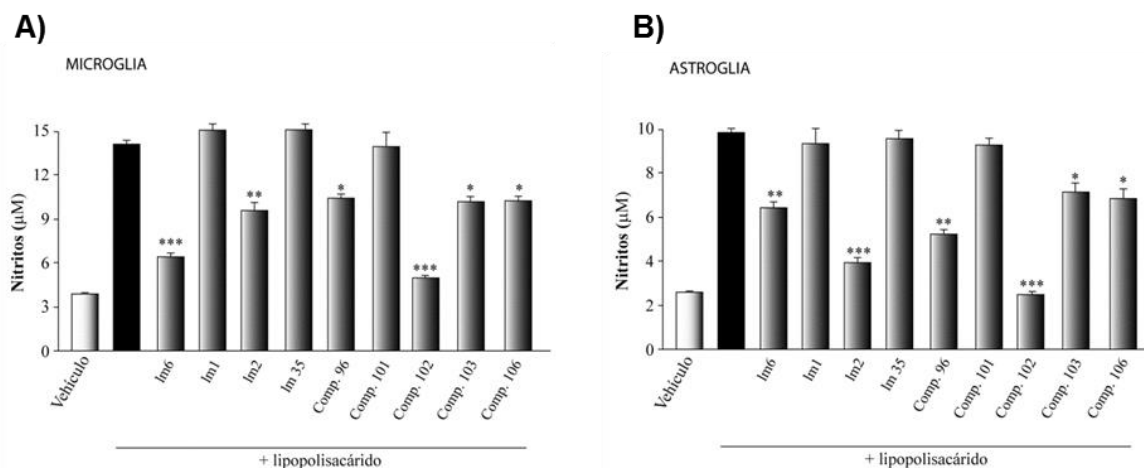


Figura 61. Medida de la producción de nitritos mediante la reacción de Griess en cultivos primarios de astroglía **(A)** y microglía **(B)**, tratado con LPS en presencia o ausencia de los inhibidores de PDE10A de la familia de los imidazoles.

2.2.2.6. Evaluación en modelos *in vivo* de la enfermedad de Parkinson

Existen diferentes modelos animales ampliamente empleados para el estudio de la enfermedad de Parkinson. Algunos de ellos emplean diferentes toxinas, tales como 6-OHDA, capaz de destruir selectivamente el sistema catecolaminérgico¹⁴⁸. La 6-OHDA es una toxina que presenta una estructura química similar a la de la dopamina, lo que le proporciona gran afinidad por los transportadores de la misma en el cerebro, pudiendo penetrar en las neuronas dopaminérgicas y destruirlas de manera selectiva. La muerte neuronal se produce debido a una auto-oxidación no enzimática que promueve la formación de radicales libres, así como a la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial. Por otro lado, otro de los modelos más ampliamente empleados para reproducir la sintomatología clínica de las enfermedades neurodegenerativas en general es aquel en el que se produce un daño inflamatorio con LPS, que provoca la activación de la microglía y la consecuente producción de citoquinas proinflamatorias y factores citotóxicos, que conducen a la muerte neuronal¹⁴⁹.

Con el fin de probar la eficacia *in vivo* de los inhibidores de PDE10A de la familia de los imidazoles en los dos modelos de la enfermedad de Parkinson citados, se seleccionó el compuesto **102** por su buena permeabilidad a la barrera hematoencefálica, así como por los resultados obtenidos en los modelos celulares anteriormente mostrados. Estos

¹⁴⁸ Schober, A. "Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP" *Cell Tissue Res.* **2004**, 318, 215-224.

¹⁴⁹ Zhong, L.-M.; Zong, Y.; Sun, L.; Guo, J.-Z.; Zhang, W.; He, Y.; Song, R.; Wang, W.-M.; Xiao, C.-J.; Lu, D. "Resveratrol inhibits inflammatory responses via the mammalian target of rapamycin signaling pathway in cultured LPS-stimulated microglial cells" *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, 7, e32195.

ensayos se han llevado a cabo en colaboración con el grupo de la Profesora Ana Pérez-Castillo (IIB-CSIC).

En el modelo de daño con 6-OHDA, se inyecta esta toxina directamente en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) de los roedores, en un único hemisferio, utilizándose el otro hemisferio como control. Por otro lado, se inyecta de la misma forma la 6-OHDA conjuntamente con el inhibidor de PDE10 **102**. Transcurridas 72 horas después de la inyección, los animales se sacrifican y se analizan los cerebros mediante tinciones inmunohistoquímicas como la tirosina hidrolasa (TH), marcador de neuronas dopaminérgicas, y la proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP) como marcador de astrocitos activados. Se observa que el tratamiento con 6-OHDA produce una pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas en el hemisferio tratado con 6-OHDA respecto al control, y que ésta se reduce cuando se administra el inhibidor de PDE10 **102**, por lo que dicho inhibidor es capaz de proteger a las neuronas de la muerte inducida por 6-OHDA (figura 62A).

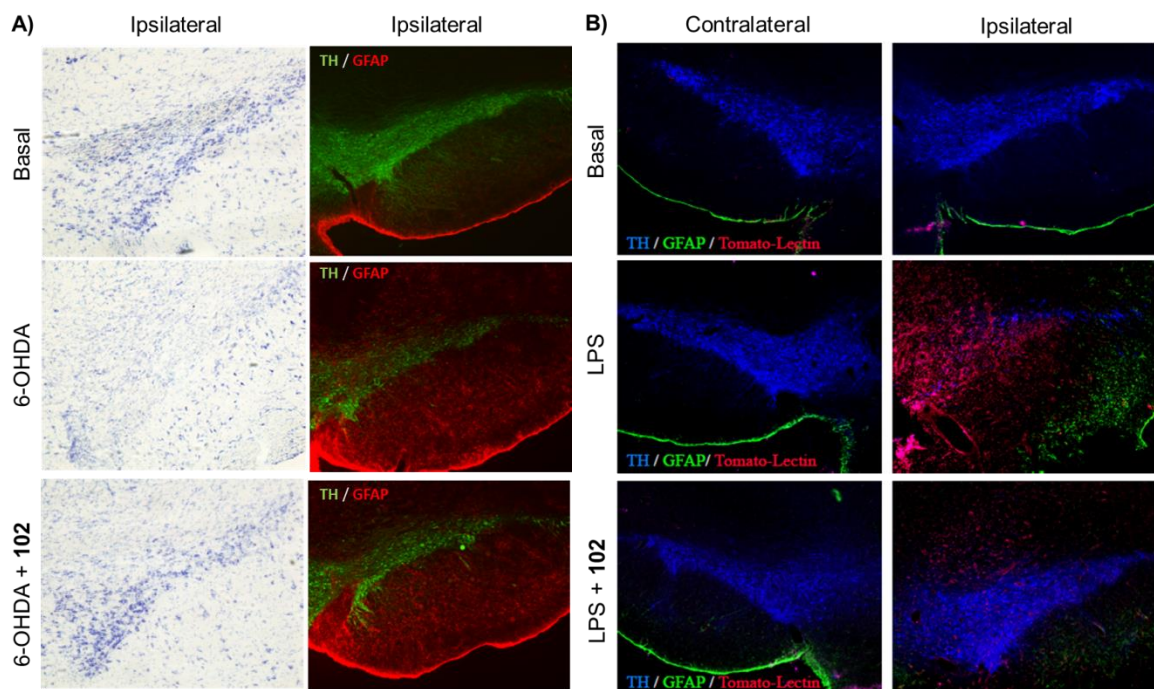


Figura 62. Efecto neuroprotector del derivado **102** en dos modelos animales de la enfermedad de Parkinson **(A)** modelo de daño con 6-OHDA y **(B)** modelo de daño con LPS.

En el modelo de daño con LPS, éste se inyecta también directamente en la SNpc de los roedores y de manera unilateral, induciendo la muerte celular de las neuronas

dopaminérgicas y la activación de la microglía cercana. Tras 72 horas, los animales se sacrifican y se analizan los cerebros mediante tinción inmunohistoquímica con TH y GFAP, mostrando que la administración del inhibidor de PDE10A **102** es capaz de proteger a las neuronas dopaminérgicas del daño inflamatorio causado por el LPS (**figura 62B**).

2.2.3. Búsqueda de moduladores alostéricos de PDE10A basados en la estructura del dominio regulador GAF

La estrategia más ampliamente usada en la regulación de la actividad catalítica de las PDEs es el diseño de inhibidores que interaccionen con la enzima en el sitio de unión de los nucleótidos cíclicos. Sin embargo, dado el alto grado de conservación de los aminoácidos en dicho sitio de unión en las diferentes PDEs, el diseño de inhibidores selectivos de unas frente a otras sigue siendo muchas veces una tarea complicada.

Una posibilidad que puede ser empleada para lograr selectividad es la regulación alostérica de la enzima, bien a través de otras cavidades diferentes del sitio de unión de los nucleótidos cíclicos dentro del dominio catalítico, o bien a través del dominio regulador, en el cual hay mayor divergencia entre las diferentes familias de PDEs.

Dentro del dominio regulador de algunas PDEs, entre ellas PDE10A, está presente el denominado dominio GAF, a través del cual se puede conseguir la regulación de los niveles de AMPc mediante la inhibición selectiva de esta PDE, evitando así posibles efectos adversos ligados a la inhibición de otras. El único ligando identificado hasta el momento capaz de unirse a este dominio GAF en PDE10A es el AMPc, siendo dicha unión capaz de activar la actividad catalítica de la misma incluso a baja concentración⁸². La aparición en 2009 de la estructura de este dominio cristalizada junto con el AMPc (PDB: 2ZMF)⁸³ abrió la puerta para entender el mecanismo de regulación de la enzima a través de dicho dominio regulador, así como al diseño de nuevos inhibidores basados en la estructura del mismo.

Así, con el fin de buscar moduladores alostéricos capaces de inhibir de manera selectiva la enzima PDE10A, se decidió llevar a cabo un cribado virtual sobre la misma utilizando como ligandos nuestra colección interna de compuestos, y empleando el AMPc como control de este estudio. Una vez identificado los diferentes prototipos, se llevó a cabo el ensayo enzimático experimental en PDE10A de los mismos a una concentración inicial de 10 μ M, empleando un ensayo radiométrico basado en la co-incubación del enzima recombinante humano PDE10A con el ³H-AMPc, siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía, y empleando el inhibidor de PDE10A **Papaverina** como control.

Para aquellos compuestos con un porcentaje de inhibición superior al 50%, se determinó la curva dosis-respuesta que permitió calcular la CI_{50} (**figura 63**).

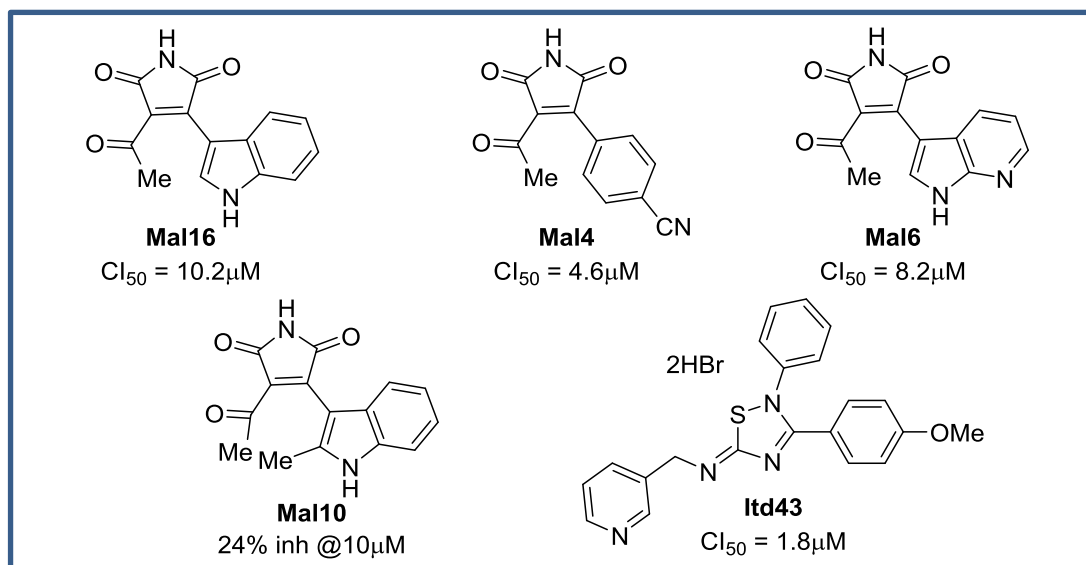


Figura 63. Prototipos identificados mediante cribado virtual en el dominio GAF de PDE10A.

Entre los prototipos identificados, se encuentran derivados de maleidimida y de iminotiadiazol, que presentaron actividades enzimáticas del orden micromolar. Puesto que la mayoría de las moléculas identificadas en este cribado eran derivados de maleidimida, se decidió evaluar algunos otros compuestos pertenecientes a esta misma familia disponibles en nuestra quimioteca (**tabla 25**).

Tabla 25. Resultados de la inhibición en PDE10A de los compuestos de la familia de las maleidimidias ensayados, expresados en forma de CI_{50} .

| Compuesto | Estructura | CI_{50} (μM) | Compuesto | Estructura | CI_{50} (μM) |
|--------------|------------|-----------------------|--------------|------------|-----------------------|
| Mal7 | | 6.5 | Mal36 | | 8.2 |
| Mal35 | | 2.4 | Mal40 | | 2.9 |

Los resultados de actividad inhibitoria obtenidos para los nuevos derivados de maleidimida fueron del orden micromolar al igual que en los prototipos inicialmente identificados. Dado que en el ensayo experimental se empleó la enzima completa (dominio catalítico y dominio regulador), se decidió profundizar en el estudio teórico de estos inhibidores para confirmar si los datos de inhibición obtenidos eran debidos o no a la unión del inhibidor al dominio GAF. Así, se llevó a cabo un análisis comparativo de las energías de unión encontradas para uno de estos derivados de maleidimida (**Mal4**) tanto en la estructura del dominio GAF de la enzima (PDB: 2ZMF) como en la del dominio catalítico de la misma (PDB: 2OUP). Además, dado que los derivados de imidazol fueron previamente identificados como inhibidores de PDE10A que se unen al sitio activo del dominio catalítico, se seleccionó el derivado **Im2** y se estudiaron de la misma manera las energías de unión en ambos dominios de la proteína. Como controles para validar este estudio se emplearon los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc. La estabilidad de la unión de cada uno de los ligandos en los dos dominios de la proteína se evaluó según la función de puntuación asociada a la unión proteína-ligando (**tabla 26**).

Tabla 26. Funciones de puntuación de la unión ligando-dominio GAF de PDE10A.

| Dominio | AMPc | GMPc | Im2 | Mal4 |
|------------|--------|--------|--------|--------|
| Catalítico | -4.133 | -2.816 | -9.386 | -4.803 |
| GAF | -8.071 | -1.040 | -1.395 | -8.898 |

Los datos de la **tabla 26** muestran, en primer lugar, que el valor obtenido para la unión del AMPc en el dominio GAF es notablemente superior al del GMPc, mientras que en el caso del dominio catalítico hay menor diferencia entre los valores obtenidos para ambos nucleótidos. Esto se debe a que, al ser PDE10A una enzima dual, tanto el AMPc como el GMPc pueden unirse a su centro catalítico, mientras que solo el AMPc es capaz de unirse al dominio GAF de la misma⁸³.

En cuanto a los resultados obtenidos para el derivado **Mal4**, la energía de unión en el dominio GAF es muy superior a la del sitio catalítico (**tabla 26**). Un análisis visual del modo de unión de este compuesto en el dominio GAF de la proteína muestra diferentes interacciones importantes, la mayoría de las cuales se conservan en el resto de derivados de maleidimida: la interacción por puente de hidrógeno del grupo NH de la maleidimida con Cys287, uno de los aminoácidos importantes de este sitio de unión, así como enlaces de hidrógeno de los dos grupos carbonilo del anillo de maleidimida con los aminoácidos Asp305 y Gln383. Adicionalmente, en este derivado **Mal4** aparece una doble interacción del grupo nitrilo con Ala330 y Asn353 (**figura 64**).

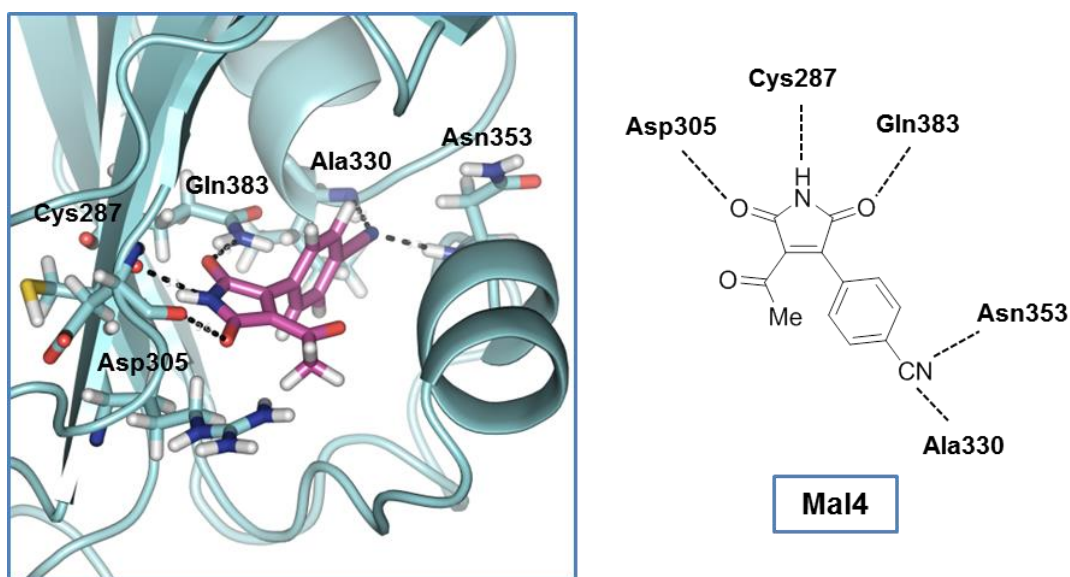


Figura 64. Modo de unión del derivado de maleidimida **Mal4** en el sitio de unión del AMPc del dominio GAF de PDE10A.

Por su parte, el derivado de imidazol **Im2**, presenta una energía de unión mucho mayor en el sitio activo del dominio catalítico que en el dominio GAF (**tabla 26**). La inspección visual de este resultado mostró que, dado el mayor tamaño de este derivado de imidazol y el pequeño tamaño del sitio de unión del dominio GAF, esta molécula no es capaz de acceder a dicho bolsillo y, por lo tanto, no se une a la enzima en esa zona (**figura 65**), confirmando este dato que este inhibidor y, por extensión, todos los pertenecientes a la misma familia, se unen al dominio catalítico de la enzima.

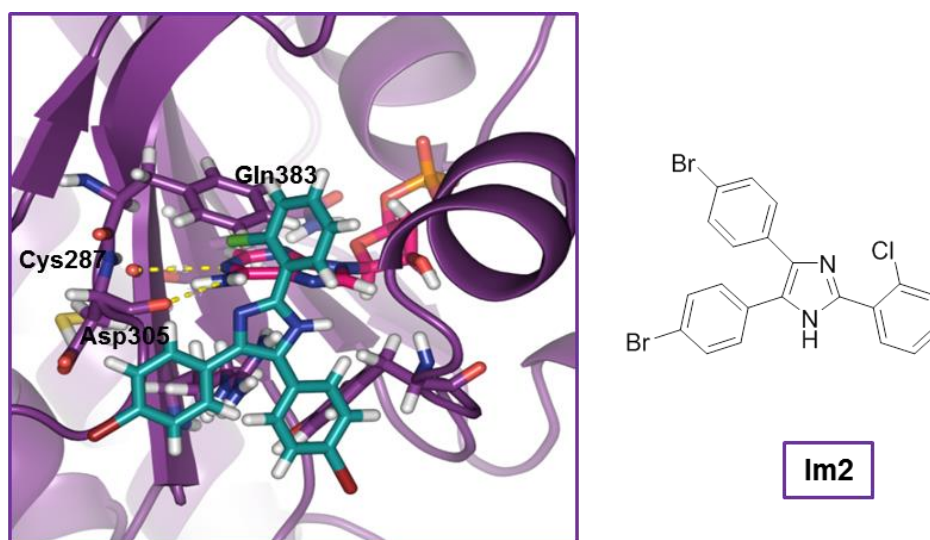


Figura 65. Comparación entre el modo de unión del derivado **Im2** (azul) y **AMPc** (rosa) en el dominio GAF de PDE10A.

Como prueba experimental de la posible unión de los derivados de maleidimida al dominio regulador GAF, se decidió evaluar la maleidimida **Mal4** en un conjunto de diferentes PDEs, ya que las características estructurales de este dominio GAF son únicas en PDE10A y por lo tanto, si nuestra hipótesis es cierta, el compuesto debería ser selectivo frente al resto de fosfodiesterasas evaluadas. Este y otros ensayos experimentales están actualmente en curso con el fin de demostrar de manera experimental la posibilidad de regulación alostérica de la enzima PDE10A mediante la unión de estos derivados de maleidimida al dominio GAF.

En este capítulo se han identificado diferentes inhibidores químicamente diversos de PDE10A basados en la estructura de la misma. Por un lado, se ha diseñado y sintetizado una familia de imidazoles basados en un prototipo encontrado mediante cribado virtual en el sitio activo de la enzima, que han mostrado eficacia en modelos in vitro de la enfermedad de Parkinson. Así mismo, uno de los inhibidores de PDE10A seleccionados ha mostrado eficacia en modelos in vivo de la enfermedad, validando PDE10A como diana terapéutica para el tratamiento de dicha patología. La otra familia identificada, derivados de tioxoquinazolina S-sustituidos, desarrollados previamente como inhibidores de PDE7A, ha permitido estudiar las diferencias existentes entre PDE10A y PDE7A mediante un análisis de la superficie completa del dominio catalítico de la primera. Por último, se ha llevado a cabo la identificación de los derivados de maleidimida como inhibidores de PDE10A basados en la estructura del dominio regulador GAF, habiéndose llevado a cabo estudios teóricos del modo de unión, y estando en curso los estudios experimentales para corroborar esta hipótesis teórica.

3. DISEÑO DE INHIBIDORES DE PDE8 Y OBTENCIÓN DE NUEVOS DERIVADOS DE 3-ACILINDAZOL MEDIANTE TÉCNICAS DE SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA

3.1. Introducción

Como ya se ha visto a lo largo de este trabajo, los inhibidores de PDEs expresadas en cerebro podrían constituir una estrategia terapéutica novedosa para el tratamiento de enfermedades del SNC, gracias a su beneficioso papel tanto en la inflamación como en la plasticidad neuronal. PDE8 es una de las PDEs expresadas en cerebro (**figura 6**) y, por lo tanto, podría ser interesante estudiar el papel de los inhibidores de esta enzima en modelos de enfermedades neurodegenerativas. De hecho, en 2003, se publicó un estudio de los niveles de expresión de PDE8B en cerebros de pacientes de Alzheimer, y se observó un notable aumento de los mismos en los pacientes que se encontraban en una fase avanzada de la enfermedad, lo que avalaría la inhibición de esta enzima como un posible tratamiento para esta patología⁷⁴. También se ha descrito que una mutación en el gen *PDE8B* está asociada a la aparición de la degeneración estriatal autosómica dominante (ASDS), una enfermedad clasificada como rara que afecta a la parte estriatal de los ganglios basales, y que comparte algunos síntomas con la enfermedad de Parkinson, tales como bradicinesia y rigidez muscular⁷¹. Además, recientemente se ha demostrado que la inactivación del gen *PDE8B* en roedores produce una mejora en los síntomas motores y en la memoria⁷⁵, resultado que apoyaría el estudio de los inhibidores de PDE8 como posibles fármacos para el tratamiento de patologías como la enfermedad de Parkinson, donde tanto los síntomas motores como los cognitivos están presentes.

No obstante, la función biológica de PDE8 ha sido poco estudiada, debido principalmente a la falta de inhibidores selectivos de esta enzima hasta hace relativamente poco tiempo^{78,79}. Por ello, con el fin de estudiar el posible potencial terapéutico de la inhibición de PDE8 en las enfermedades neurodegenerativas y dada la falta de inhibidores selectivos de esta enzima, se decidió llevar a cabo el diseño y la síntesis de nuevos inhibidores de la misma basados en la estructura de esta PDE.

3.2. Diseño de nuevos inhibidores de fosfodiesterasa 8

Existen a día de hoy dos estructuras de la enzima PDE8A depositadas en el *Protein Data Bank* (códigos PDB: 3ECN y 3ECM)¹⁵⁰, de las cuales la primera está cocrystalizada con el AMPc y la segunda sin ligando. La disponibilidad de estas estructuras

¹⁵⁰ Wang, H.; Yan, Z.; Yang, S.; Cai, J.; Robinson, H.; Ke, H. "Kinetic and structural studies of phosphodiesterase-8A and implication on the inhibitor selectivity" *Biochemistry* **2008**, 47, 12760-12768.

cristalográficas nos ha permitido llevar a cabo el diseño de nuevos inhibidores de PDE8 basado en la estructura de la enzima.

Tal y como se ha visto a lo largo de este trabajo, el centro activo del dominio catalítico de todas las PDEs está altamente conservado en cuanto a su secuencia de aminoácidos. Destacan, entre otros, dos residuos de Phe (Phe767 y Phe781 en PDE8A) y una Gln (Gln778 en PDE8A), con los que la inmensa mayoría de los inhibidores de las diferentes PDEs presentan interacciones fundamentales para la actividad biológica. Por otro lado, dada la importancia de obtener inhibidores selectivos de unas PDEs frente a otras, una opción para diseñarlos es lograr que estos sean capaces de interaccionar con aquellos residuos presentes solamente en una determinada fosfodiesterasa en cuestión. Concretamente, el sitio activo de PDE8A presenta como principal diferencia con respecto al resto de PDEs la presencia de un residuo de Tyr (Tyr748) en la misma posición que en las demás PDEs encontramos una Phe¹⁵⁰ (**figura 66A**).

Una vez analizados los requisitos estructurales del sitio activo de esta PDE, se decidió tomar como base de los nuevos inhibidores a sintetizar un heterociclo benzoanelado 6+5 que contuviese nitrógeno en su estructura, por similitud con el esqueleto central de adenina presente en la estructura del AMPc, ligando endógeno de esta enzima. De entre todos los existentes, se eligió el indazol en este caso, ya que este heterociclo sería capaz de establecer interacciones aromáticas con los residuos de Phe781 y Phe767 anteriormente mencionados, presentando además la ventaja frente a otros como la adenina y el indol, de ser mucho más novedoso desde el punto de vista químico. Por otro lado, con el fin de potenciar las interacciones tanto con la Gln778 como con la Tyr748, el indazol en cuestión debía presentar sustitución tanto en el anillo de 5 como en el de 6 miembros (**figura 66B**). Así, la interacción con la Gln778, proporcionaría un aumento de la potencia inhibitoria, y la interacción con la Tyr748, concretamente con el grupo hidroxilo de la misma, además de contribuir a la capacidad inhibitoria, sería muy importante para la selectividad de los compuestos diseñados.

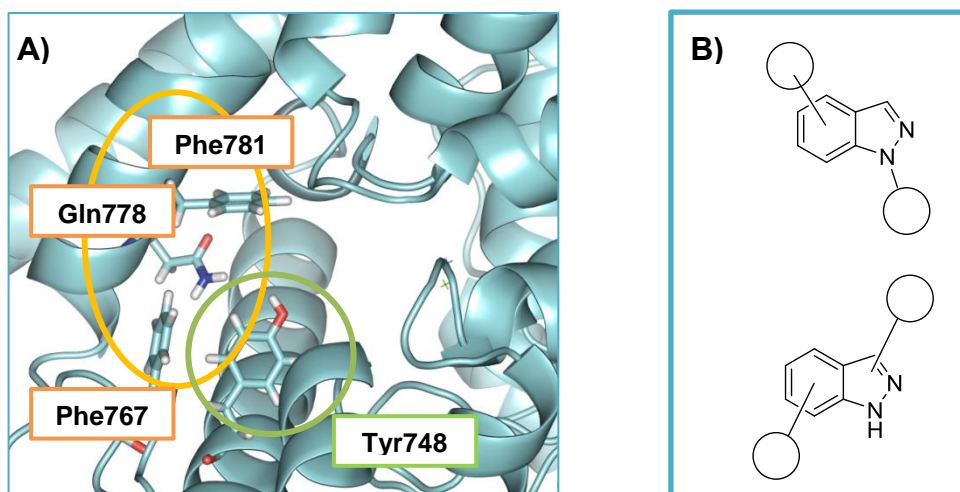


Figura 66. (A) Aminoácidos más importantes en el centro activo de la enzima PDE8A. **(B)** Estructura general de los indazoles disustituídos propuestos.

3.3. Síntesis en fase sólida de derivados de 3-acilindazol

La preparación de derivados de 3-acilindazol se puede llevar a cabo mediante la reacción del correspondiente derivado de 3,3-diisopropiltriazeno con cloruro de acilo¹⁵¹, si bien esta ruta sintética presenta el problema de que varias etapas requieren purificaciones cromatográficas tediosas.

La síntesis en fase sólida ofrece una serie de ventajas que permite obtener de forma más rápida y eficiente nuevos derivados heterocíclicos. Por ello, con el fin de llevar a cabo la síntesis de los derivados de indazol propuestos en fase sólida, realicé una estancia en el grupo del Profesor Stefan Bräse, en el “Karlsruhe Institute for Technology” (Alemania).

La síntesis en fase sólida fue descrita por primera vez en 1963 por Bruce Merrifield¹⁵², y desde entonces ha sido aplicada con éxito para la síntesis de moléculas orgánicas en el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos. Esta metodología consiste en el empleo de un soporte polimérico, al cual se ancla inicialmente un determinado fragmento químico que actúa como conector entre este soporte y la molécula sobre la que se irán realizando las diferentes transformaciones químicas, de manera que cada etapa de reacción puede ser purificada fácilmente mediante lavado y filtración del soporte sólido. El paso final consiste en el desanclaje de la molécula formada del soporte, obteniéndose el producto deseado (**figura 67**).

¹⁵¹ Reingruber, R.; Vanderheiden, S.; Muller, T.; Nieger, M.; Es-Sayed, M.; Bräse, S. “Efficient synthesis of substituted 3-acyl-3,4-dihydrobenzo[d][1,2,3]triazines” *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 3439-3442.

¹⁵² Merrifield, R.B. “Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide” *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.

Entre las ventajas que presenta este tipo de síntesis se encuentran la posibilidad de emplear exceso de reactivos para llevar a cabo las transformaciones químicas, la fácil purificación mediante lavado y filtración y la posibilidad de automatización del proceso.

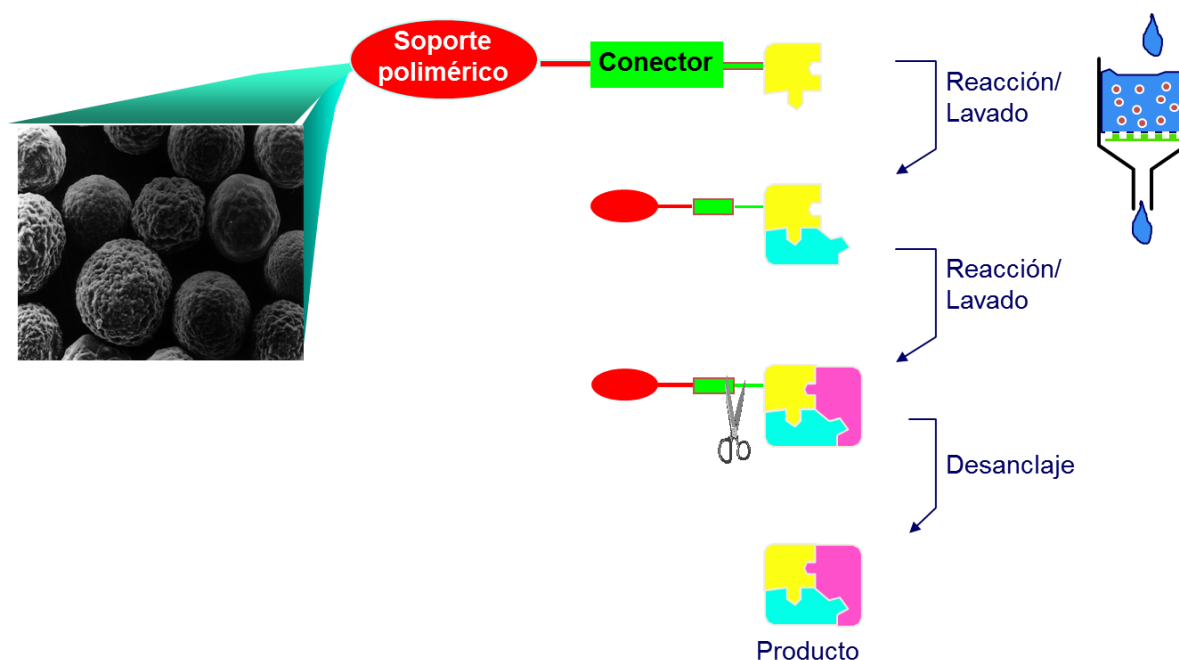
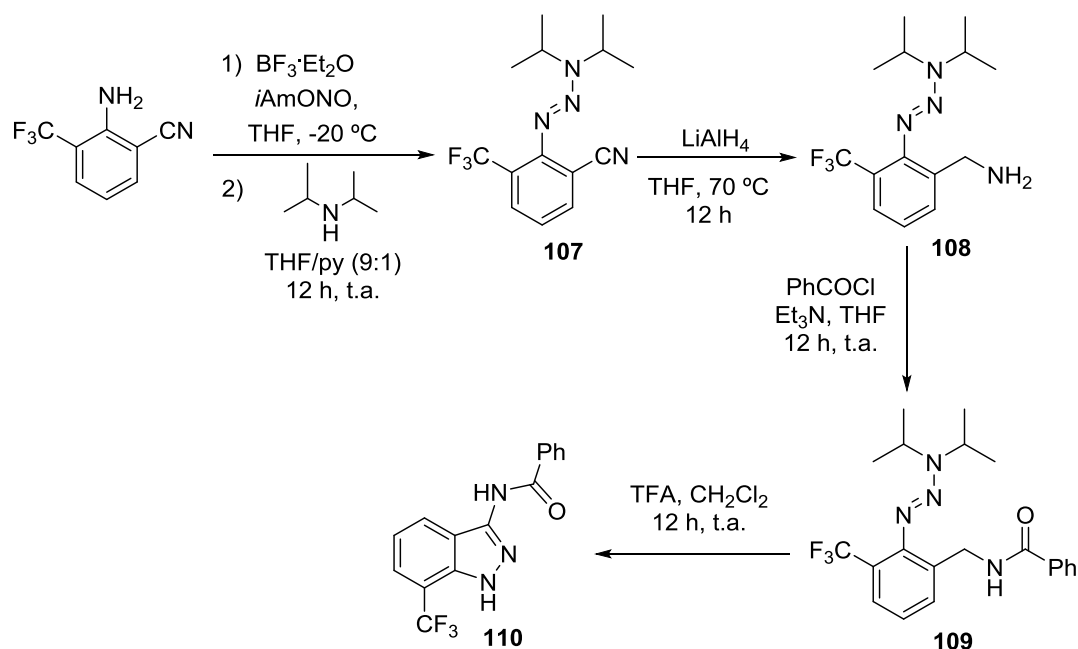


Figura 67. Esquema general del proceso de síntesis en fase sólida.

Con el fin de obtener los heterociclos propuestos, se llevó a cabo en primer lugar la síntesis en disolución de la *N*-[7-(trifluorometil)-1*H*-indazol-3-il]benzamida (**110**), previamente descrita¹⁵¹, para luego extrapolar estas condiciones a fase sólida (**esquema 17**). Para ello, el 2-amino-3-trifluorometilbenzonitrilo se transformó en la sal de diazonio por tratamiento con trifluoruro de boro eterato y nitrito de isoamilo, que se hizo reaccionar *in situ* con diisopropilamina, dando lugar al triazeno **107**. A continuación, se llevó a cabo la reducción del grupo nitrilo hasta la correspondiente amina **108** empleando hidruro de litio y aluminio como agente reductor. La amina **108** se hizo reaccionar con cloruro de benzoilo para obtener la amida **109** y, finalmente, por tratamiento con ácido trifluoroacético en diclorometano, se desprotegió de nuevo la sal de diazonio, que mediante ciclación *in situ* dio lugar al 3-acilindazol **110** como producto final. Cada uno de los productos intermedios de dicha síntesis fue aislado y caracterizado mediante las técnicas analíticas y espectroscópicas adecuadas, tal y como se muestra en la parte experimental.



Esquema 17. Esquema de síntesis en disolución del indazol **110**¹⁵¹.

A continuación, para poder llevar a cabo la síntesis en fase sólida de estos derivados de indazol, fue necesario seleccionar la resina más adecuada así como el conector más conveniente. Con esta finalidad, se decidió utilizar como soporte sólido la resina de Merrifield (**R1**) y, respecto al conector, se eligió el conector de triazeno T1¹⁵³ por analogía con el proceso llevado a cabo en disolución. Este conector permite el anclaje a la resina de aminas aromáticas previa formación de las sales de diazonio correspondientes, y ha mostrado ser ampliamente versátil para la obtención de heterociclos benzoanelados entre otras estructuras químicas¹⁵⁴ (**figura 68**).

¹⁵³ Bräse, S.; Enders, D.; Köbberling, J.; Avemaria, F. "A surprising solid-phase effect: Development of a recyclable "traceless" linker system for reactions on solid support" *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 3413-3415.

¹⁵⁴ Bräse, S. "The virtue of the multifunctional triazene linkers in the efficient solid-phase synthesis of heterocycle libraries" *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 805-816.

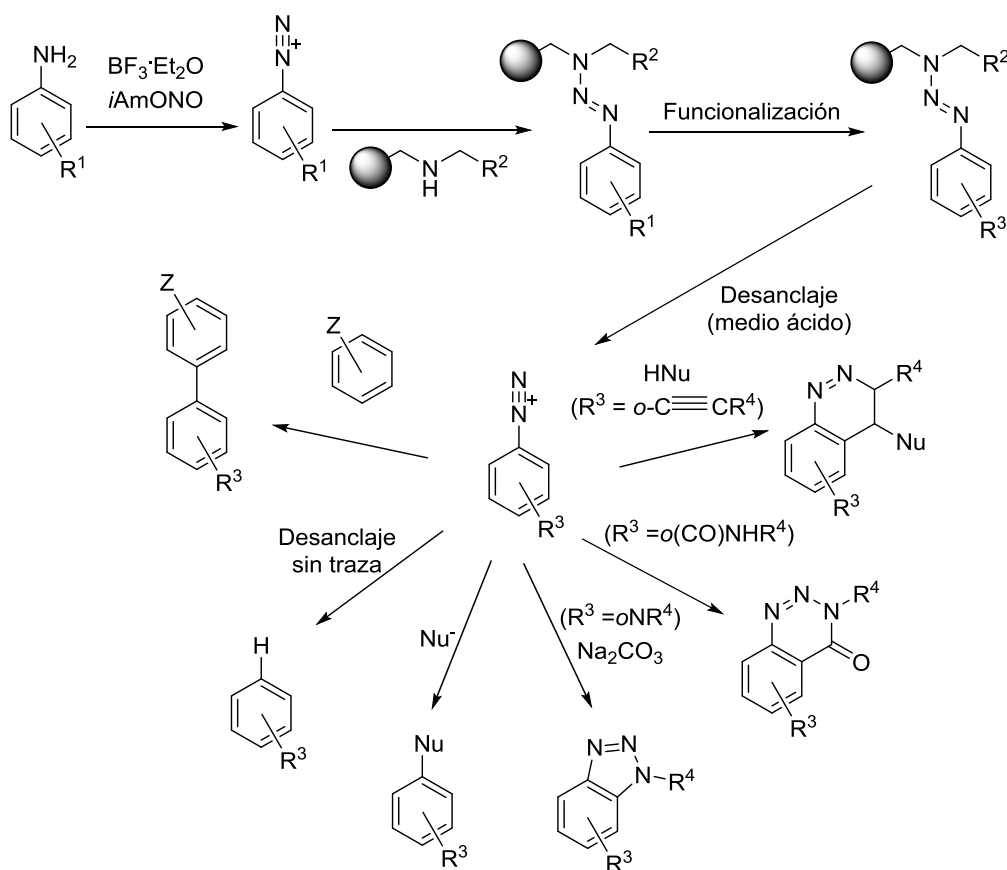
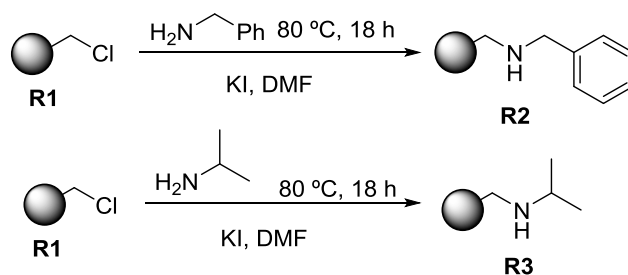


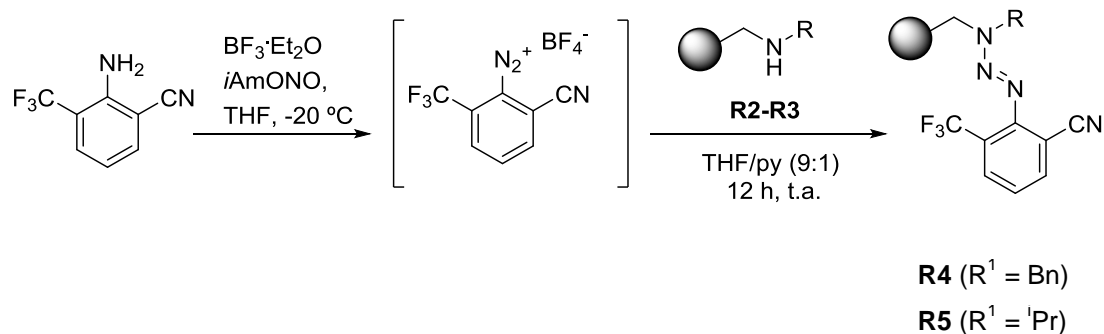
Figura 68. Versatilidad sintética del conector de triazeno T1¹⁵⁴.

Una vez elegido el conector de triazeno T1, se funcionalizó la resina de Merrifield **R1** tanto con bencilamina como con isopropilamina, para dar lugar a dos resinas diferentes **R2** y **R3**. La selección de la isopropilamina se hizo debido a que era la empleada en el procedimiento en disolución, mientras que la bencilamina se eligió por ser la que se utiliza comúnmente en muchas de las rutas en fase sólida que emplean el conector T1¹⁵⁴. Esta reacción se llevó a cabo tratando la resina **R1** con la correspondiente amina, empleando yoduro de potasio en DMF, y calentando la mezcla de reacción a 80 °C durante 18 horas (**esquema 18**).



Esquema 18. Síntesis de las resinas empleadas en la puesta a punto de la ruta de síntesis en fase sólida.

Una vez que teníamos las resinas funcionalizadas, se procedió a hacerlas reaccionar con la sal de diazonio formada por diazotación del 2-amino-3-trifluorometilbenzonitrilo con trifluoruro de boro eterato y nitrito de isoamilo. De esta manera se obtuvieron las resinas **R4** y **R5** (**esquema 19**).



Esquema 19. Síntesis de las resinas de triazeno **R4** y **R5**.

Una vez sintetizadas las resinas **R4** y **R5**, se llevó a cabo en primer lugar un test analítico capaz de determinar la formación del grupo triazeno, mediante la reacción del tetrafluoroborato de 2-bencil-1,3-ditianilinio con el grupo triazeno inmovilizado en la resina, formándose el diazocompuesto correspondiente¹⁵⁵. La aparición de una coloración roja intensa al añadir el derivado de ditianilinio sobre una suspensión de la correspondiente resina en diclorometano, confirmaba la presencia del grupo triazeno en la misma (**figura 69**). Así, en la resina **R5** se observó este cambio de color rápidamente, lo que confirmó el anclaje de la sal de diazonio a la resina, mientras que en el caso de **R4** no se observó un cambio tan inmediato de color.

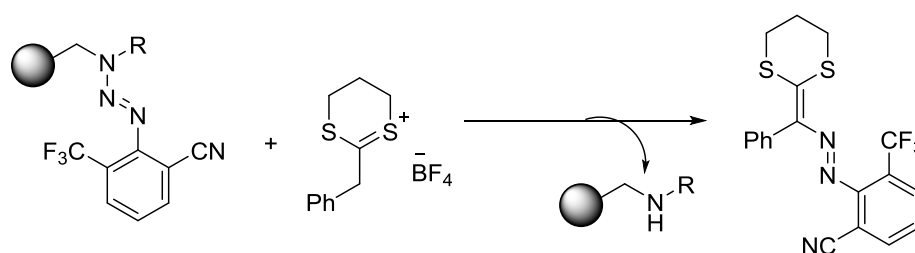


Figura 69. Reacción del tetrafluoroborato de 2-bencil-1,3-ditianilinio con el triazeno soportado.

¹⁵⁵ Jung, N.; Stanek, B.; Grässle, S.; Nieger, M.; Bräse, S. "Reactions of resin-bound triazenes with dithianylium tetrafluoroborates: efficient synthesis of α -azo ketene dithioacetals and related hydrazones" *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1112-1115.

A continuación, para llevar a cabo la caracterización analítica de estas resinas de triazeno, se empleó la espectroscopía Raman, ya que el grupo nitrilo presenta una banda de absorción característica en torno a $2220\text{--}2225\text{ cm}^{-1}$. Empleando esta técnica espectroscópica, se llevó a cabo un análisis comparativo de las resinas **R4** y **R5**, con el fin de determinar cuál de ellas era la más adecuada para continuar con el proceso (**figura 70**). De las dos resinas sintetizadas, la resina de Merrifield funcionalizada con la isopropilamina (**R5**) es la que mostró una banda de absorción correspondiente al grupo nitrilo más clara.

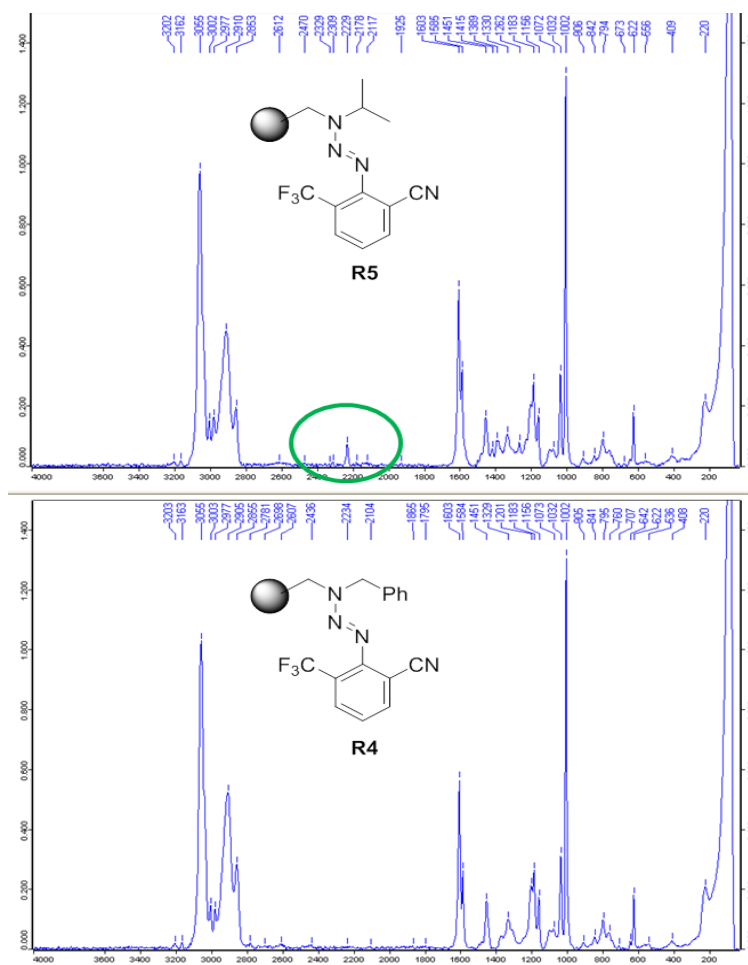
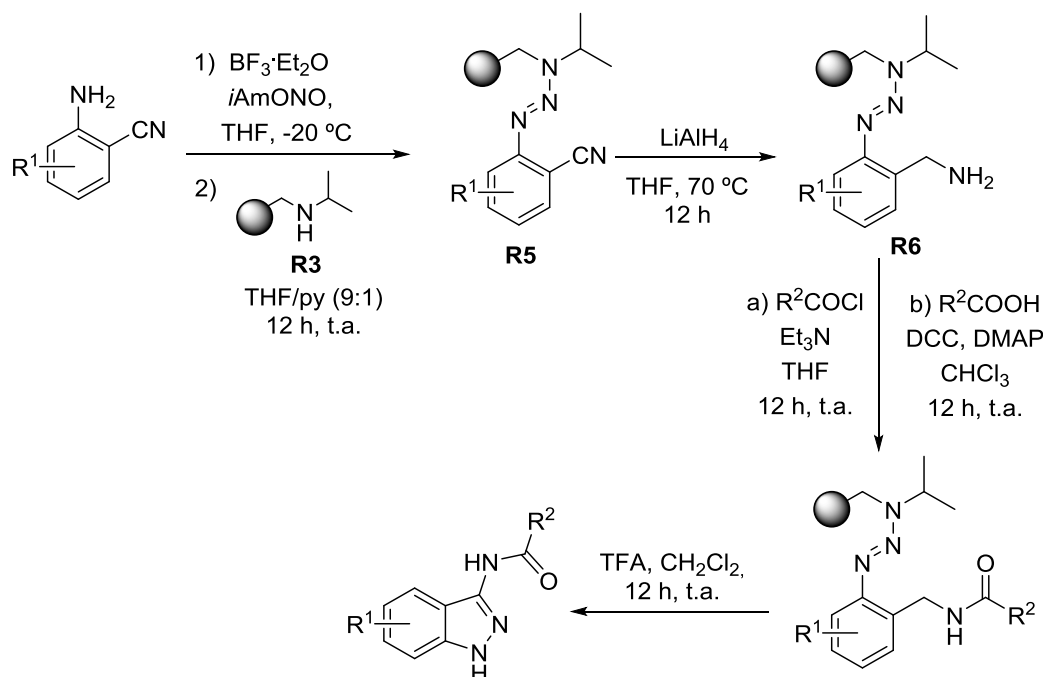


Figura 70. Espectro Raman de las resinas **R4** y **R5**.

Así, tanto el test colorimétrico como la espectroscopía Raman mostraron que el empleo de la isopropilamina soportada (**R5**) era más adecuado para continuar el proceso que el empleo de la bencilamina (**R4**), ya que permitía la formación del triazeno más eficazmente.

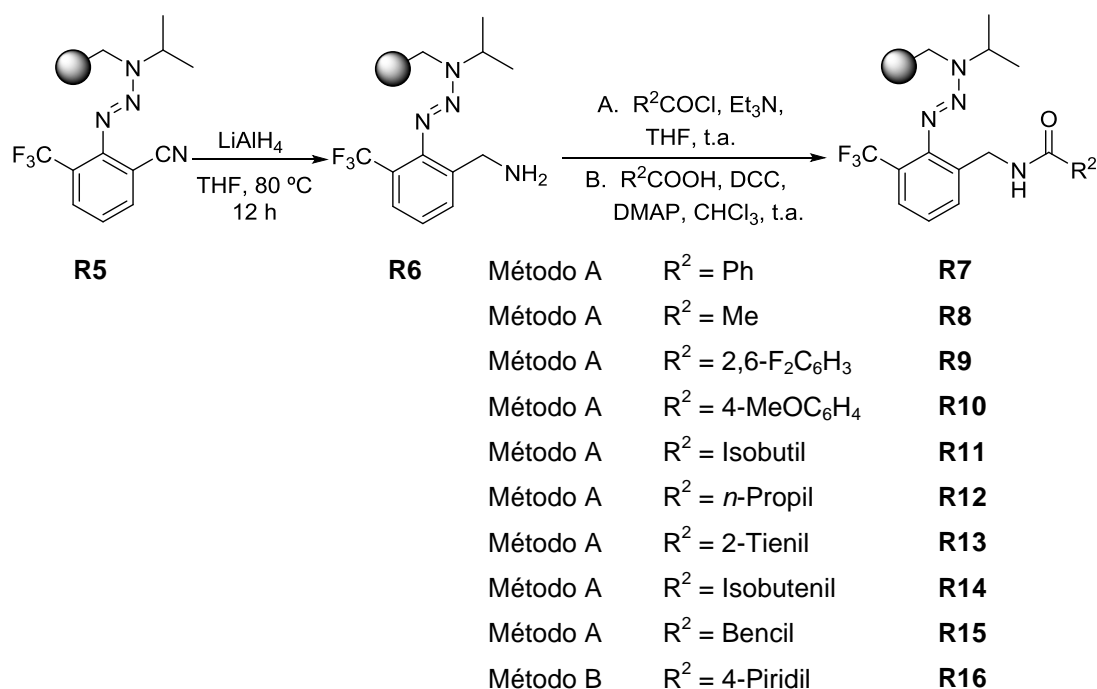
Por tanto, nos propusimos llevar a cabo la síntesis de indazoles en fase sólida por extrapolación de la correspondiente ruta en solución empleando la resina **R3** en la que se

había inmovilizado la isopropilamina empleando como soporte sólido la resina de Merrifield **R1** (**esquema 20**).



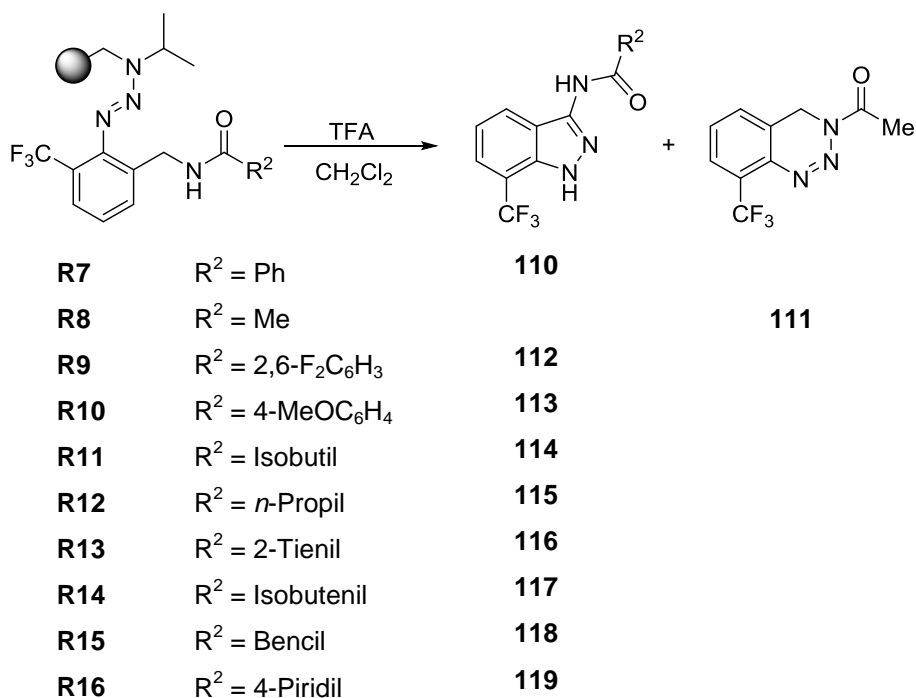
Esquema 20. Esquema de síntesis en fase sólida de indazoles.

La inmovilización del 2-amino-3-trifluorometilbenzonitrilo se llevó a cabo mediante el conector de triazeno empleando la isopropilamina soportada **R3**, siguiendo el procedimiento descrito en el **esquema 20**. A continuación, se llevó a cabo la reducción del grupo nitrilo de la resina **R5** empleando hidruro de litio y aluminio para obtener la amina correspondiente (**R6**), que posteriormente se transformó en un grupo amida empleando, a diferencia del proceso descrito en disolución, dos posibles vías: bien mediante reacción con el cloruro de ácido correspondiente empleando trietilamina en THF (método A) o bien empleando el correspondiente ácido carboxílico en presencia de DCC y DMAP, utilizando cloroformo como disolvente (método B). El empleo de ácidos carboxílicos en esta etapa del proceso permitió ampliar la diversidad estructural de los derivados sintetizados, dada la gran variedad de ácidos comercialmente disponibles. Así, se emplearon diferentes ácidos carboxílicos y cloruros de ácido, tanto de naturaleza aromática (fenilos diferentemente sustituidos y heterociclos como piridina o tiofeno), como de naturaleza alifática que permitieron la obtención de las resinas **R7-R16** diferentemente funcionalizadas (**esquema 21**).



Esquema 21. Reacción de formación de amida mediante los métodos A y B para la síntesis de las resinas **R7-R16**.

Finalmente, el tratamiento con ácido trifluoroacético en diclorometano de las resinas **R7-R16** permitió desanclar la molécula del soporte sólido, generándose de nuevo la sal de diazonio, que por ciclación *in situ* dio lugar a los heterociclos **110-119** (**esquema 22**).

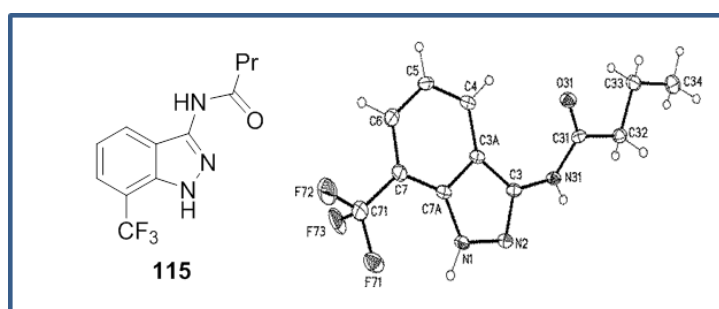


Esquema 22. Heterociclos (**110-119**) obtenidos por desanclaje de las resinas **R7-R16**.

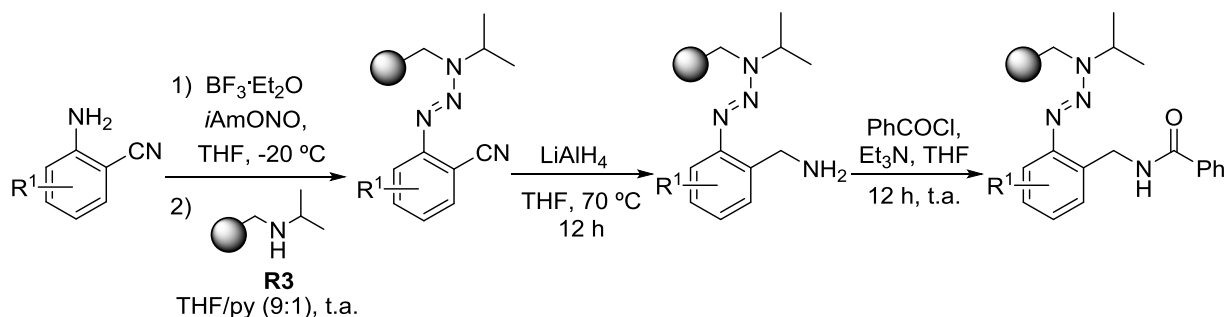
Todas las resinas obtenidas (**R1-R16**) se caracterizaron en función de su espectro de IR y la carga se calculó a partir del porcentaje de nitrógeno hallado mediante análisis elemental.

De la misma manera que ocurría en el procedimiento llevado a cabo en disolución, cuando se empleaba cloruro de acetilo ($R^2 = \text{Me}$) como derivado de ácido, se obtenía la benzotriazina **111** como producto final tras llevar a cabo el desanclaje de **R8**, sin observarse la presencia del correspondiente indazol¹⁵¹ (**esquema 22**). Sin embargo, con cualquier otro ácido o cloruro de ácido, independientemente de que éste presentase naturaleza aromática o alifática, el producto formado era el derivado de indazol correspondiente (**110, 112-119, esquema 22**).

Todos los derivados de indazol (**110, 112-119**) y la benzotriazina **111** obtenidos se caracterizaron empleando las técnicas analíticas y espectroscópicas adecuadas, tal y como se muestra en la parte experimental. Además, se llevó a cabo la cristalización del compuesto **115** en colaboración con el grupo del doctor Martin Nieger de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Helsinki (Finlandia), y empleando técnicas de difracción de rayos X pudo confirmarse la estructura de dicho derivado de indazol de manera inequívoca (**figura 71**).



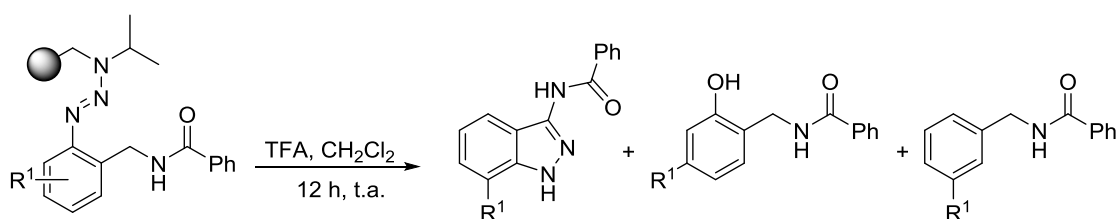
las posiciones 3, 4 y 5; flúor en la posición 5; así como los derivados 3,5-disustituídos con cloro o bromo. Siguiendo el mismo procedimiento descrito en el **esquema 20** se sintetizaron las resinas de triazeno **R31-R37** (**esquema 23**), empleando en todas ellas el cloruro de benzoilo como agente acilante.



| | | | |
|--------------------------------|------------|------------|------------|
| $\text{R}^1 = 3\text{-Cl}$ | R17 | R24 | R31 |
| $\text{R}^1 = 3,5\text{-diCl}$ | R18 | R25 | R32 |
| $\text{R}^1 = 3,5\text{-diBr}$ | R19 | R26 | R33 |
| $\text{R}^1 = \text{H}$ | R20 | R27 | R34 |
| $\text{R}^1 = 4\text{-Cl}$ | R21 | R28 | R35 |
| $\text{R}^1 = 5\text{-F}$ | R22 | R29 | R36 |
| $\text{R}^1 = 5\text{-Cl}$ | R23 | R30 | R37 |

Esquema 23. Síntesis de las resinas **R31-R37** a partir de los correspondientes 2-aminonitrilos de partida.

Finalmente, por tratamiento con ácido trifluoroacético en diclorometano, se obtuvieron los productos **120-126** (**esquema 24**).



| | | | |
|------------|--------------------------------|------------|------------|
| R31 | $\text{R}^1 = 3\text{-Cl}$ | 120 | |
| R32 | $\text{R}^1 = 3,5\text{-diCl}$ | 121 | |
| R33 | $\text{R}^1 = 3,5\text{-diBr}$ | 122 | |
| R34 | $\text{R}^1 = \text{H}$ | | 123 |
| R35 | $\text{R}^1 = 4\text{-Cl}$ | | 124 |
| R36 | $\text{R}^1 = 5\text{-F}$ | | 125 |
| R37 | $\text{R}^1 = 5\text{-Cl}$ | | 126 |

Esquema 24. Reacción de desanclaje de las resinas **R31-R37** para obtener los productos finales **120-126**.

El empleo de diferentes derivados de 2-aminonitrilo como productos de partida demostró que la sustitución en la posición 3 del anillo aromático del producto de partida era un requisito necesario para que se produjera la ciclación tras el desanclaje de la resina y, por lo tanto, para la obtención del derivado de 3-acilindazol deseado (**120-122**, **esquema 24**). Sin embargo, en los casos en los que los sustituyentes se encontraban en las posiciones 4 o 5 del producto de partida, la ciclación no tenía lugar, obteniéndose en este caso como productos secundarios bien el producto correspondiente a la hidrólisis (derivados **123** y **124**) o bien el producto de desanclaje sin traza (derivados **125** y **126**).

Es importante destacar en este punto que cada uno de los diferentes productos finales obtenidos tras el desanclaje de la resina con ácido trifluoroacético se formaba de manera exclusiva en cada caso, es decir, dependiendo de la sustitución del benzonitrilo inicial, se obtuvo el indazol o la benzotriazina, el producto de hidrólisis o el producto sin traza, respectivamente, pero en ningún caso se observaba la formación de dos o más de estos productos de manera simultánea. Por otro lado, en los casos en los que el desanclaje no conducía a la ciclación, la formación de los dos tipos de productos secundarios (producto sin traza y producto de hidrólisis) podría explicarse en base a la distinta estabilidad de la sal de diazonio formada como resultado del tratamiento con ácido trifluoroacético de la resina¹⁵⁶: cuando se tiene un sustituyente, tal como el cloro, con pares de electrones libres en posición 5 en el benzonitrilo inicial (que estaría en posición 4 respecto a la sal de diazonio), éste puede contribuir a la estabilización de la carga positiva de la sal de diazonio, mientras que si este átomo de cloro se encuentra en la posición 3 respecto a la sal de diazonio, no es capaz de estabilizarla y las trazas de agua presentes en el ácido trifluoroacético conducen a la hidrólisis. Por tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos para todos los compuestos formados mediante este procedimiento (**110-126**), se pudo concluir que la ciclación sigue un mecanismo diferente solo cuando R² es metilo, por lo que no depende ésta, como podría esperarse en un principio, de la naturaleza alifática o aromática de dicho sustituyente; y que además el efecto del sustituyente en la posición 3 del benzonitrilo de partida es imprescindible para favorecer la ciclación que da lugar a la formación del heterociclo final, puesto que este compuesto no se obtiene en ninguno de los otros casos (**figura 72**).

¹⁵⁶ Dahmen, S.; Bräse, S. "The first stable diazonium salt on solid support – investigations on stability and an usage as linker and scavenger in solid-phase organic synthesis", *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3681-3683.

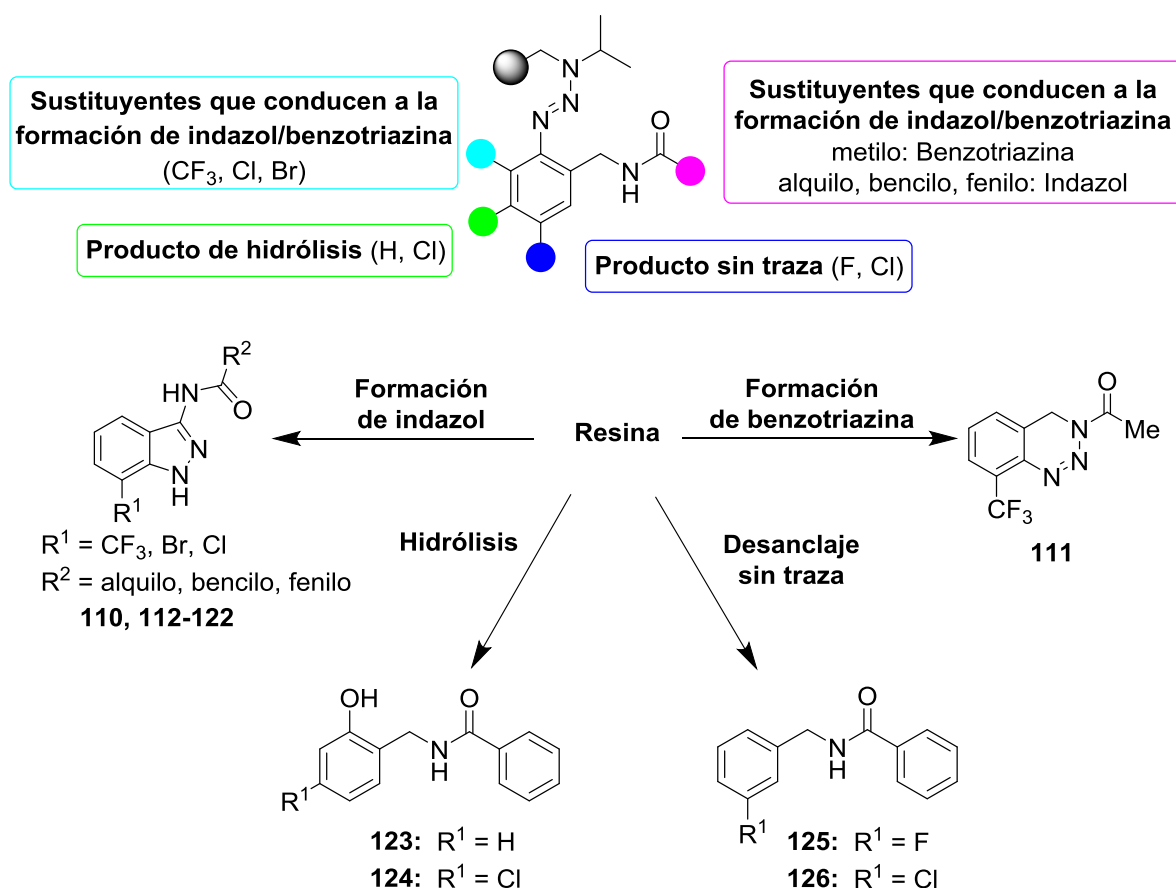
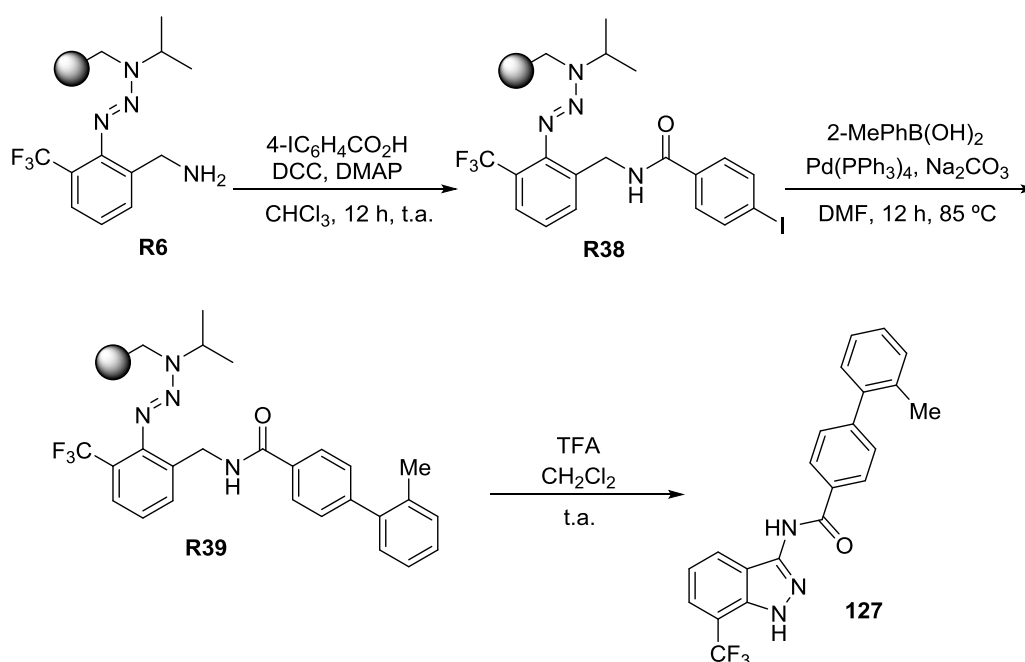


Figura 72. Productos obtenidos con los diferentes 2-aminobenzonitrilo de partida.

Por último, con el fin de poder ampliar el método a la síntesis de indazoles con una mayor variedad estructural y de confirmar la compatibilidad de la reacción de acoplamiento C-C con el conector y el soporte sólido utilizados, se llevó a cabo una reacción de acoplamiento de Suzuki sobre la resina **R38**, previamente sintetizada por acilación de la amina soportada **R6** con el cloruro de 4-iodofenilbenzoilo. Para llevar a cabo este tipo de transformación, se empleó un derivado de ácido borónico junto con carbonato de sodio y cantidades catalíticas de Pd(PPh₃)₄, y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación orbital durante 12 horas a 85 °C¹⁵⁷ (**R39**). A continuación, se trató la resina **R39** con ácido trifluoroacético en diclorometano al igual que en los casos anteriores, obteniéndose el indazol **127** como producto final (**esquema 25**), lo que permitió confirmar la posibilidad de ampliar la metodología diseñada para la obtención de derivados de indazol con mayor variedad estructural por acoplamiento con otros ácidos borónicos.

¹⁵⁷ Gil, C.; Schwögler, A.; Bräse, S. "The synthesis of 3-substituted 6-aryl-3H-benzo[a][1,2,3]triazinones using polymer-bound triazenes" *J. Comb. Chem.* **2004**, 6, 38-42.



Esquema 25. Síntesis del derivado de 3-acilindazol **127** a partir de la amina soportada **R6**.

Los diferentes derivados obtenidos a partir de los nuevos 2-aminobenzonitrilos de partida (**116-123**) fueron aislados y caracterizados mediante las técnicas analíticas y espectroscópicas adecuadas, tal y como aparece detallado en la parte experimental.

3.4. Evaluación enzimática de los nuevos derivados sintetizados

Para llevar a cabo la evaluación enzimática de estos compuestos, se está poniendo a punto un ensayo radiométrico basado en la co-incubación del enzima recombinante humano PDE8A con el ³H-AMPC en colaboración con el grupo de las Profesoras M. Isabel Cadavid y M. Isabel Loza en la Universidad de Santiago de Compostela. Este es un proyecto que estamos comenzando en nuestro laboratorio y no tenemos aún datos de evaluación enzimática disponibles.

En este capítulo, se ha llevado a cabo el diseño de nuevos inhibidores de la enzima PDE8A basados en la estructura de la misma. Además, se ha diseñado una nueva metodología para la obtención de nuevos derivados de indazol estructuralmente diversos mediante técnicas de síntesis en fase sólida empleando el conector de triazeno T1, habiéndose estudiado los requisitos estructurales necesarios en el 2-aminobenzonitrilo de partida para la obtención de dichos heterociclos como productos finales, y habiendo

determinado la naturaleza de cada uno de los subproductos obtenidos en el resto de los casos.

CONCLUSIONES

En esta memoria se han diseñado y sintetizado inhibidores de PDE7 y PDE10A como agentes terapéuticos prometedores para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Los puntos más relevantes de este trabajo se recogen a continuación:

- ❖ Se han diseñado y sintetizado derivados de tioquinazolina *S*-alquilados como moléculas de reemplazo de S14, inhibidor de PDE7 en desarrollo preclínico para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.
- ❖ A partir de un cribado fenotípico, se ha desarrollado una nueva familia de derivados de sulfuro como inhibidores de PDE7A, y se ha mostrado su eficacia en modelos *in vitro* de la enfermedad de Parkinson.
- ❖ Se ha demostrado la ausencia de efectos eméticos *in vivo* de diferentes familias de inhibidores de PDE7, lo que refuerza la utilidad terapéutica de estos nuevos candidatos a fármaco.
- ❖ Se han identificado y caracterizado los diferentes productos de oxidación química de algunos inhibidores de PDE7 pertenecientes a la familia de los sulfuros.
- ❖ Se ha estudiado el proceso de oxidación metabólica *in vitro* de dos derivados de diarilsulfuro, habiéndose identificado el principal metabolito formado en este proceso.
- ❖ Se ha identificado una familia de derivados de imidazol como inhibidores de PDE10A y se ha estudiado su modo de unión a la enzima de manera teórica.
- ❖ Se ha mostrado la eficacia *in vitro* de los inhibidores de PDE10A de la familia de imidazoles en modelos celulares de la enfermedad de Parkinson. El estudio de eficacia *in vivo* se encuentra actualmente en curso.
- ❖ Se ha mostrado el potencial antiinflamatorio de los inhibidores de PDE7A y de PDE10A en cultivos primarios de astrogliá y microgliá.
- ❖ Se ha identificado una familia de derivados de maleidimida como inhibidores de PDE10A, cuya validación experimental como moduladores alostéricos de dicha fosfodiesterasa está actualmente en curso.

- ❖ Se ha diseñado una nueva familia de derivados de indazol como inhibidores de PDE8 basados en la estructura cristalográfica de la enzima.
- ❖ Se ha desarrollado un nuevo procedimiento de síntesis en fase sólida de derivados de 3-acilindazol empleando el conector de triazeno T1, habiéndose determinado los requisitos necesarios para la formación de dicho heterociclo mediante este procedimiento sintético.

DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las diferentes fases del desarrollo de la presente tesis doctoral, han dado lugar hasta la fecha, a las siguientes publicaciones y presentaciones en congresos.

Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral:

- ❖ Garcia, A.M.; Redondo, M.; Martinez, A.; Gil, C. "Phosphodiesterase 10 inhibitors: new disease modifying drugs for Parkinson's disease?" *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 1171-1187.
- ❖ Garcia, A.M.; Brea, J.; Morales-García, J.A.; Perez, D.I.; González, A.; Alonso-Gil, S.; Gracia-Rubio, I.; Ros-Simó, C.; Conde, S.; Cadavid, M.I.; Loza, M.I.; Perez-Castillo, A.; Valverde, O.; Martinez, A.; Gil, C. "Modulation of cAMP specific PDE without emetogenic activity: new sulfide-like PDE7 inhibitors" *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8590-8607.
- ❖ Garcia, A.M.; Jung, N.; Gil, C.; Nieger, M.; Bräse, S. "Solid phase synthesis of functionalized indazoles using triazenes – scope and limitations" *RSC Adv.* **2015** (enviado).

Presentaciones en congresos derivadas de la Tesis Doctoral:

- ❖ "Molecular modeling of new PDE10 inhibitors: docking, synthesis and biological evaluation". García, A. M.; Loza, M.; Luque, F. J.; Martinez, A.; Gil, C. XVII Congreso de la Sociedad Española de Química Terapéutica, Madrid, España, 2 al 4 de octubre de **2013**. Comunicación (tipo póster).
- ❖ "Modulation of cAMP specific PDE without emetogenic activity: new sulfide-like PDE7 inhibitors". Gil, C.; García, A. M.; Brea, J.; Morales-García, J. A.; Perez, D. I.; González, A.; Alonso-Gil, S.; Gracia-Rubio, I.; Ros-Simó, C.; Conde, S.; Cadavid, M. I.; Loza, M. I.; Perez-Castillo, A.; Valverde, O.; Martinez, A. XXIII International Symposium on Medicinal Chemistry. Lisboa, Portugal, 7 al 11 de Septiembre de **2014**, Comunicación (tipo poster). *ChemMedChem* **2014**.

Patentes desarrolladas durante la Tesis Doctoral:

- ❖ Martínez, A.; Gil, C.; García, A.M.; Pérez, D.I. “Qinazolinas S-sustituidas y sus aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de enfermedades mediadas por PDE-7” Patente No. ES201530720, **2015**. Patente en explotación, licenciada con exclusividad a la empresa Araclon Biotech.

PARTE EXPERIMENTAL

1. PROCEDIMIENTOS QUÍMICOS

1.1. Técnicas y aparatos

Los productos de partida comerciales fueron obtenidos de los proveedores correspondientes Sigma-Aldrich, Alfa Aesar y Acros Organics. La resina de Merrifield fue obtenida de la casa Polymer Laboratories (resina PL-CMS 0.94 mmol/g, 75-150 μ m, CMS 191). La masa molecular de las resinas y la carga de las mismas se empleó la siguiente fórmula:

$$Masa\ molar = \frac{1000}{carga_{anterior}} - (masa\ molar_{perdida} - masa\ molar_{añadida})$$

El dispositivo de microondas utilizado en la optimización fue un equipo Initiator™ de Biotage®. Las reacciones fueron seguidas por cromatografía en capa fina, utilizando placas de cromatografía compuestas por gel de sílice Merck tipo 60 F254 de un espesor de capa 0.2 mm. Los cromatofolios fueron revelados con luz ultravioleta de 254/365 nm y con mezclas de ácido fosfomolibdico en etanol. Los brutos de reacción, en su mayoría, han sido purificados mediante cromatografía en columna en gel de sílice Merck tipo 60 (230-400 mesh ASTM) o automática en el dispositivo IsoleraOne de Biotage®, utilizando columnas SF10-4g si 50 AX1368-8 de la casa comercial Agilent Technologies y KP-Sil 10 g de Biotage®. Los eluyentes y el tipo de cromatografía empleados se indican en cada caso, y las proporciones de mezcla se indican en volumen. Los aparatos utilizados para la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear fueron: Bruker AVANCE-300 (300 MHz), Varian INNOVA-300 (300 MHz), Bruker AM-400 (400 MHz), Varian INNOVA-400 (400 MHz), Varian MERCURY-400 (400 MHz), Bruker AM-500 (500 MHz) y Varian-500 (500 MHz). Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en ppm y son obtenidos tomando como referencia el disolvente deuterado utilizado en cada caso. La multiplicidad de las señales (s: singlete, sa: singlete ancho, d: doblete, dd: doblete, ddd: doblete de doblete, t: triplete, td: triplete de doblete, tt: triplete triplete, sext: sextuplete, hept: heptuplete, m: multiplete), las constantes de acoplamiento (J = Hz) y la asignación estructural se indican en cada caso. El cromatógrafo de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) utilizado para cuantificar la pureza de los productos fue un Alliance Waters 2690 con un detector de UV Photodiodo Array modelo Waters 2996 acoplado a un detector de EM modelo MicromassZQ de Waters, cuyos valores se expresan en unidades de masa (m/z). Se utilizó una columna SunFire™ C18, 3.5 μ m, 4.6 mm x 50 mm y como eluyente mezclas de CH₃CN/H₂O en gradiente 10:100 en

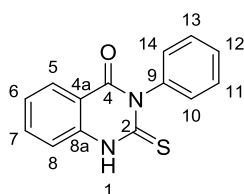
5 minutos. La espectrometría de masas (EM) se realizó en un espectrómetro LC/MSD serie 100 Hewlett Packard para técnicas de Electrospray positivo (ESI+) y en un espectrómetro Finnigan MAT 90 (70 eV) para técnicas de impacto electrónico (IE). Los valores se expresan en unidades de masa (m/z). Los puntos de fusión (P.f.) se midieron en un aparato MP70 de Mettler Toledo. La espectroscopia infrarroja (IR) se llevó a cabo con cristal de diamante (ATR) en un Bruker ALPHA-IR. El análisis elemental de los compuestos está en el rango de ± 0.4 respecto de los valores teóricos calculados para las fórmulas empíricas y se han realizado en el departamento de Análisis y Técnicas Instrumentales del Centro Nacional de Química Orgánica "Lora Tamayo" (CENQUIOR-CSIC), con un analizador Heraeus CHN-O-rapid.

1.2. Síntesis de derivados de tioxoquinazolina

1.2.1. Síntesis de tioxoquinazolinas

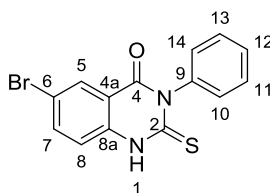
Sobre una disolución del derivado del ácido antranílico correspondiente (1 equiv) en 3 mL del disolvente indicado, se añade el derivado de fenilisotiocianato (1.5 equiv) correspondiente. La mezcla de reacción se agita bajo irradiación microondas a la temperatura y durante el tiempo que se indica en cada caso. Finalmente, se aísla y purifica el producto final según se indica para cada uno de los derivados.

3-Fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina¹⁰⁸ (S14)



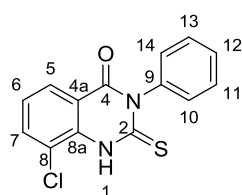
Reactivos: antranilato de metilo (6.6 mmol, 0.9 mL), fenilisotiocianato (9.9 mmol, 1.3 mL). Disolvente: mezcla de DMSO/H₂O (1:1). Agitación bajo irradiación microondas (120 °C, 40 min). **P.f.** 307-308 °C (lit.¹⁰⁸ 305-306 °C).

6-Bromo-3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina¹⁰⁸ (14)



Reactivos: ácido 2-amino-5-bromobenzoico (1.4 mmol, 300.0 mg), fenilisotiocianato (1.8 mmol, 0.2 mL). Disolvente: mezcla de DMSO/H₂O 1:1. Agitación bajo irradiación microondas (120 °C, 40 min) **P.f.** 326-329 °C (lit.¹⁰⁸ 322-325 °C).

8-Cloro-3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (15)

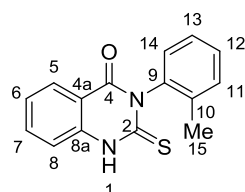


Reactivos: ácido 2-amino-4-clorobenzoico (0.9 mmol, 150.0 mg), fenilisotiocianato (1.8 mmol, 0.2 mL). Disolvente: mezcla de DMSO/H₂O (1:1). Agitación bajo irradiación microondas (120 °C, 40 min). Purificación: cromatografía circular centrífuga (acetato de etilo/hexano, 1:5). Rendimiento: sólido blanco (68.5 mg, 27%). **P.f.**

190-191 °C. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 9.54 (s, 1 H, H-1), 8.09 (dd, J = 8.0, 1.4 Hz, 1 H,

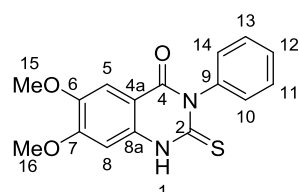
H-5), 8.02 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1 H, H-7), 7.59-7.54 (m, 1 H, H-6), 7.52-7.40 (m, 3 H, H-ar), 7.30-7.21 (m, 2 H, H-ar). $^{13}\text{C RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 176.6 (C-2), 164.6 (C-4), 138.1 (C-9), 137.0 (C-8a), 132.4 (C-7), 129.9 (C-6), 129.8 (C-12), 129.2 (2 C-ar), 128.6 (2 C-ar), 125.8 (C-5), 124.6 (C-8), 117.2 (C-4a). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (m/z): 289 [$M + 1$], 291 [$M + 3$]. **Análisis elemental** ($\text{C}_{14}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{OS}$): Calculado %C 58.23, %H 3.14, %N 9.70, %S 11.10. Hallado: %C 58.01, %H 3.22, %N 9.67, %S 10.94.

3-(2-Metilfenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (16)



Reactivos: antranilato de metilo (0.7 mmol, 100.0 mg), 2-metilfenilisotiocianato (1.0 mmol, 0.1 mL). Disolvente: mezcla de DMSO/ H_2O (1:1). Agitación bajo irradiación microondas (120 °C, 40 min). Aislamiento: filtración a vacío del sólido formado. Rendimiento: sólido blanco (184.0 mg, 98%). **P.f.** 267-268 °C (lit.¹⁵⁸ 267-268 °C). $^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 11.15 (s, 1 H, H-1), 7.99 (dd, $J = 7.9, 1.5$ Hz, 1 H, H-5), 7.82 (ddd, $J = 7.9, 7.3, 1.5$ Hz, 1 H, H-7), 7.48 (d, $J = 8.1$, 1 H, H-11), 7.43-7.29 (m, 4 H, H-ar), 7.27-7.14 (m, 2 H, H-ar), 2.06 (s, 3 H, H-15). $^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 175.3 (C-2), 159.3 (C-4), 139.7 (C-9), 138.2 (C-ar), 135.8 (C-8a), 135.2 (C-7), 130.5 (C-11), 128.8 (C-5), 128.4 (C-ar), 127.5 (C-ar), 126.8 (C-ar), 124.5 (C-ar), 115.8 (C-ar), 115.7 (C-4a), 17.0 (C-15). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (m/z): 269 [$M + 1$]. **Análisis elemental** ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{OS}$): Calculado %C 67.14, %H 4.51, %N 10.44, %S 11.95. Hallado %C 66.98, %H 4.65, %N 10.40, %S 12.16.

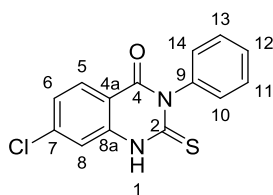
3-Fenil-6,7-dimetoxi-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina¹⁰⁹ (17)



Reactivos: 2-amino-4,5-dimetoxibenzoato de metilo (1.0 mmol, 200.0 mg), fenilisotiocianato (1.3 mmol, 0.2 mL), Disolvente: DMSO/ H_2O (1:1). Agitación bajo irradiación microondas (120 °C, 40 min). Purificación: se enfría la mezcla de reacción en un baño de agua y sal y se filtra a vacío el sólido formado. Rendimiento: sólido blanco (187.9 mg, 63%). **P.f.** 317 °C (lit.¹⁰⁹ 316 °C).

¹⁵⁸ Alagarsamy, V.; Giridhar, R.; Yadav, M. R. "Synthesis and pharmacological investigation of novel 1 substituted-4-phenyl-1,2,4-triazolo[4,3-a]quinazolin-5(4H)-ones as a new class of H1-antihistaminic agents" *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, 15, 1877-1880.

7-Cloro-3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (18)



Reactivos: ácido 2-amino-4-clorobenzoico (0.3 mmol, 50.0 mg), fenilisotiocianato (0.5 mmol, 0.1 mL). Disolvente: mezcla de DMSO/H₂O (1:1). Agitación bajo irradiación microondas (120 °C, 40 min). Purificación: cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano, 1:10). Rendimiento: sólido amarillo pálido (54.0 mg, 65%). **P.f.** 312-313 °C.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.07 (s, 1 H, H-1), 7.93 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H-5), 7.51-7.42 (m, 3 H, H-11, H-12, H-13), 7.42-7.36 (m, 1 H, H-8), 7.35 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1 H, H-6), 7.28-7.22 (m, 2 H, H-10, H-14). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 177.2 (C-2), 159.9 (C-4), 141.2, 140.6 (C-7, C-8a), 139.8 (C-9), 130.3 (C-12), 129.6 (C-11, C-13), 129.5 (C-10, C-14), 128.9 (C-6), 125.1 (C-5), 125.0 (C-8), 115.7 (C-4a). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 289 [M + 1], 291 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₄H₉ClN₂OS): Calculado %C 58.23, %H 3.14, %N 9.70, %S 11.10. Hallado: %C 58.02, %H 3.01, %N 9.62, %S 10.98.

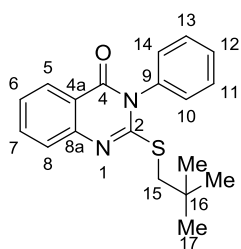
1.2.2. Síntesis de tioxoquinazolinas S-alquiladas

Método A

Sobre una disolución de la 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina correspondiente (1 equiv) en 5 mL de acetonitrilo se añade el agente alquilante (1.5 equiv) en presencia de carbonato de cesio (3 equiv). La mezcla de reacción se agita bajo irradiación microondas a 150 °C y durante el tiempo que se indica en cada caso. Finalmente, se elimina el disolvente evaporando a presión reducida. Tras purificación cromatográfica del residuo empleando los eluyentes que se indican en cada caso, se obtienen los productos deseados.

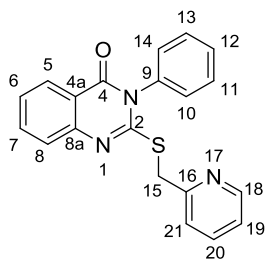
Método B

Sobre una disolución de la 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina correspondiente (1 equiv) en 5 mL de acetonitrilo se añade carbonato de cesio (3 equiv) y la mezcla se agita bajo irradiación microondas a 80 °C durante 30 minutos. A continuación, se añade el agente alquilante (1.5 equiv) y se vuelve a agitar la mezcla durante 30 minutos a la misma temperatura. Finalmente, se elimina el disolvente evaporando a presión reducida. Tras purificación cromatográfica del residuo empleando los eluyentes que se indican en cada caso, se obtienen los productos deseados.

3-Fenil-2-neopentiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (19)

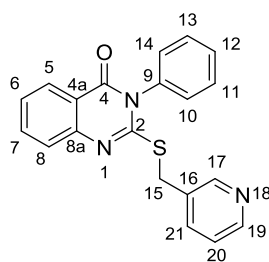
Método A. Reactivos: 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (**S14**) (0.6 mmol, 150.0 mg), bromuro de neopentilo (0.9 mmol, 0.09 mL), carbonato de cesio (1.2 mmol, 391.0 mg). Agitación bajo irradiación microondas (2 h). Purificación: cromatografía en columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:6). Rendimiento: sólido blanco (82.0 mg, 40%). **P.f.** 161-162 °C. **¹H RMN**

(300 MHz, CDCl₃): δ 8.24 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1 H, H-5), 7.78-7.68 (m, 2 H, H-ar), 7.58-7.52 (m, 3 H, H-ar), 7.39 (dd, *J* = 7.9, 7.0 Hz, 1 H, H-6), 7.34-7.29 (m, 2 H, H-ar), 3.24 (s, 2 H, H-15), 1.06 (s, 9 H, H-17). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃): δ 162.4 (C-4), 158.3 (C-2), 148.1 (C-8a), 136.6 (C-ar), 134.9 (C-7), 129.7 (C-ar), 129.6 (C-ar), 129.2 (C-ar), 127.2 (C-5), 126.1 (C-6), 125.6 (C-8), 116.2 (C-4a), 46.2 (C-15), 32.3 (C-16), 29.3 (C-17). **Pureza por HPLC** >98%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 325 [M + 1]. **Análisis elemental** (C₁₉H₂₀N₂OS): Calculado %C 70.34, %H 6.21, %N 8.63, %S 9.88. Hallado %C 70.12, %H 6.50, %N 8.66, %S 9.69.

3-Fenil-2-(2-piridilmetiltio)-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (20)

Método B. Reactivos: 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (**S14**) (0.8 mmol, 200.0 mg), hidrobromuro de 2-bromometilpiridina (1.2 mmol, 303.5 mg), carbonato de cesio (2.4 mmol, 769.6 mg). Purificación: cromatografía en columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:4). Rendimiento: sólido marrón (204.2 mg, 74%). **P.f.** 173-174 °C. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃): δ 8.45 (ddd, *J* = 4.8, 1.9, 1.0 Hz, 1 H, H-18), 8.06 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1 H, H-5), 7.83 (ddd, *J* = 8.6, 7.2, 1.6 Hz, 1 H, H-7), 7.72 (td, *J* = 7.6, 1.8 Hz, 1 H, H-20), 7.65 (dd, *J* = 7.6, 1.1 Hz, 1 H, H-21), 7.60-7.49 (m, 3 H, H-ar), 7.43-7.39 (m, 4 H, H-ar), 7.24 (ddd, *J* = 7.6, 4.8, 1.1 Hz, 1 H, H-19), 4.50 (s, 2 H, H-15). **¹³C RMN** (100 MHz, CDCl₃): δ 162.0 (C-4), 156.8 (C-2), 156.6 (C-16), 148.3 (C-18), 147.9 (C-8a), 135.8 (C-20), 135.6 (C-9), 135.0 (C-7), 130.3 (C-5), 130.0 (C-ar), 129.4 (C-ar), 127.5 (C-ar), 126.4 (C-6), 126.2 (C-8), 124.5 (C-21), 122.9 (C-19), 120.2 (C-4a), 38.8 (C-15). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 346 [M + 1]. **Análisis elemental** (C₂₀H₁₅N₃OS): Calculado %C 69.54, %H 4.38, %N 12.17, %S 9.28. Hallado %C 69.81, %H 4.65, %N 12.32, %S 9.00.

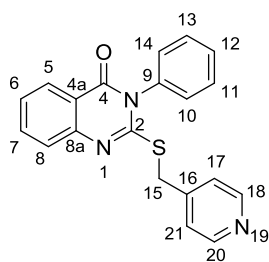
3-Fenil-2-(3-piridilmetiltio)-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (21)



Método B. Reactivos: 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (**S14**) (0.8 mmol, 200.0 mg), hidrobromuro de 3-bromometilpiridina (1.2 mmol, 303.5 mg), carbonato de cesio (2.4 mmol, 769.6 mg). Purificación: cromatografía en columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:4). Rendimiento: sólido blanco (212.0 mg, 77%). **P.f.** 154-155 °C. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃): δ 8.71 (d, *J*

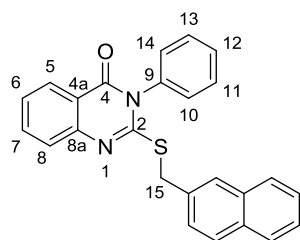
= 2.5 Hz, 1 H, H-17), 8.49 (d, *J* = 4.4 Hz, 1 H, H-19), 8.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H, H-5), 7.80-7.77 (m, 1 H, H-ar), 7.75 (d, *J* = 6.9 Hz, 1 H, H-21), 7.67 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H, H-8), 7.57-7.50 (m, 3 H, H-ar), 7.42 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, H-6), 7.33-7.25 (m, 3 H, H-ar), 4.38 (s, 2 H, H-15). **¹³C RMN** (100 MHz, CDCl₃): δ 161.9 (C-4), 156.3 (C-2), 150.0 (C-ar), 148.0 (C-ar), 147.8 (C-8a), 135.8 (C-9), 135.1 (C-7), 133.8 (C-ar), 130.4 (C-5), 130.0 (2 C-ar), 129.4 (2 C-ar), 127.6 (C-ar), 126.4 (C-ar), 126.2 (C-8), 123.8 (C-ar), 123.7 (C-6), 120.2 (C-4a), 34.0 (C-15). **Pureza por HPLC** >98%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 346 [M + 1]. **Análisis elemental** (C₂₀H₁₅N₃OS): Calculado %C 69.54, %H 4.38, %N 12.17, %S 9.28. Hallado %C 69.75, %H 4.61, %N 12.02, %S 9.05.

3-Fenil-2-(4-piridilmetiltio)-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (22)

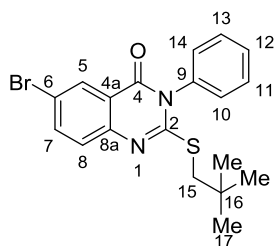


Método B. Reactivos: 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (**S14**) (0.8 mmol, 200.0 mg), bromuro de 4-piridilmetilo (1.2 mmol, 303.5 mg), carbonato de cesio (2.4 mmol, 769.6 mg). Purificación: cromatografía en columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:10). Rendimiento: sólido blanco (259.0 mg, 94%).

P.f. 178-179 °C. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃): δ 8.53 (d, *J* = 6.1 Hz, 2 H, H-18, H-20), 8.24 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1 H, H-5), 7.81-7.71 (m, 1 H, H-ar), 7.65-7.58 (m, 1 H, H-ar), 7.57-7.39 (m, 4 H, H-ar), 7.38 (d, *J* = 6.1 Hz, 2 H, H-17, H-21), 7.33-7.28 (m, 2 H, H-ar), 4.37 (s, 2 H, H-15). **¹³C RMN** (100 MHz, CDCl₃): δ 161.6 (C-4), 155.8 (C-2), 149.5 (C-18, C-20), 147.5 (C-8a), 147.2 (C-16), 135.5 (C-7), 134.8 (C-9), 130.2 (C-5), 129.8 (C-ar), 129.1 (C-ar), 127.4 (C-12), 126.2 (C-6), 126.1 (C-17, C-21), 124.4 (C-8), 119.9 (C-4a), 35.2 (C-15). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 346 [M + 1]. **Análisis elemental**: (C₂₀H₁₅N₃OS): Calculado %C 69.54, %H 4.38, %N 12.17, %S 9.28. Hallado %C 69.38, %H 4.45, %N 12.06, %S 9.30.

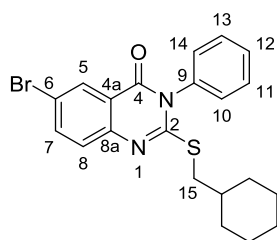
3-Fenil-2-(2-naftilmetiltio)-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (23)

Método B. Reactivos: 3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina (**S14**) (0.4 mmol, 100.0 mg), bromuro de 2-naftilmetilo (0.6 mmol, 132.7 mg), carbonato de cesio (1.2 mmol, 391.0 mg). Purificación: cromatografía en columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:16). Rendimiento: sólido blanco (47.2 mg, 30%). **P.f.** 223-224 °C. **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.99 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1 H, H-5), 7.94-7.90 (m, 1 H, H-ar), 7.82-7.68 (m, 5 H, H-ar), 7.50-7.32 (m, 9 H, H-ar), 4.56 (s, 2 H, H-15). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 161.4 (C-4), 157.5 (C-2), 147.9 (C-8a), 136.5 (C-9), 135.7 (C-ar), 135.0 (C-7), 133.4 (C-ar), 132.8 (C-ar), 130.5 (C-5), 130.2 (2 C-ar), 130.1 (2 C-ar), 128.8 (C-ar), 128.7, 128.3 (2 C-ar), 128.2 (C-ar), 128.1 (C-ar), 127.3 (C-ar), 127.0 (C-ar), 126.8, 126.7 (C-6, C-8), 120.3 (C-4a), 39.5 (C-15). **Pureza por HPLC** >98%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 395 [M + 1], 396 [M + 2]. **Análisis elemental** (C₂₅H₁₈N₂OS): Calculado %C 76.12 %H 4.60, %N 7.10, %S 8.13. Hallado %C 75.86, %H 5.04, %N 7.25, %S 7.96.

6-Bromo-3-fenil-2-neopentiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (24)

Método A. Reactivos: 6-bromo-3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina (**14**) (0.2 mmol, 70.0 mg), bromuro de neopentilo (0.3 mmol, 0.04 mL), carbonato de cesio (0.6 mmol, 195.5 mg). Agitación bajo irradiación microondas (2 h). Purificación: cromatografía circular centrífuga (acetato de etilo/hexano, 1:20). Rendimiento: sólido blanco (16.0 mg, 20%). **P.f.** 178-180 °C. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃): δ 8.34 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H-5), 7.79 (dd, *J* = 8.7, 2.4 Hz, 1 H, H-7), 7.57-7.53 (m, 3 H, H-ar), 7.49 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, H-8), 7.32-7.27 (m, 2 H, H-ar), 3.20 (s, 2 H, H-15), 0.97 (s, 9 H, H-17). **¹³C RMN** (100 MHz, CDCl₃): δ 161.0 (C-4), 159.0 (C-2), 146.7 (C-8a), 137.9 (C-7), 136.1 (C-9), 130.2 (C-5), 130.0 (C-ar), 129.9 (C-8), 129.2 (C-ar), 128.1 (C-12), 121.4 (C-6), 119.0 (C-4a), 46.1 (C-15), 32.1 (C-16), 29.1 (C-17). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 403 [M + 1], 405 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₉H₁₉BrN₂OS): Calculado %C 56.58, %H 4.75, %N 6.95, %S 7.95. Hallado %C 56.77, %H 4.84, %N 6.69, %S 7.83.

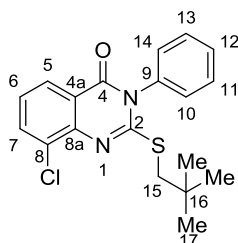
6-Bromo-2-ciclohexilmetiltio-3-fenil-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (25)



Método A. Reactivos: 6-bromo-3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina (**14**) (0.2 mmol, 70.0 mg), bromuro de ciclohexilmetilo (0.3 mmol, 0.04 mL), carbonato de cesio (0.6 mmol, 195.5 mg). Agitación bajo irradiación microondas (2 h). Purificación: cromatografía circular centrífuga (acetato de

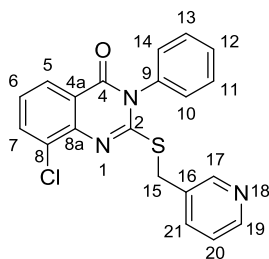
etilo/hexano, 1:16). Rendimiento: sólido amarillo (14.1 mg, 17%). **P.f.** 147-148 °C. **¹H RMN** (500 MHz, CDCl₃): δ 8.37 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, H-5), 7.82 (dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz, 1 H, H-7), 7.60-7.55 (m, 3 H, H-11, H-12, H-13), 7.51 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, H-8), 7.36-7.30 (m, 2 H, H-10, H-14), 3.09 (d, *J* = 6.8 Hz, 2 H, H-15), 1.88-1.79 (m, 3 H, H-chex), 1.77-1.69 (m, 2 H, H-chex), 1.68-1.58 (m, 2 H, H-chex), 1.33-1.10 (m, 2 H, H-chex), 1.06-0.93 (m, 2 H, H-chex). **¹³C RMN** (125 MHz, CDCl₃): 161.2 (C-4), 159.1 (C-2), 147.1 (C-8a), 138.0 (C-9), 136.3 (C-7), 130.4 (C-5), 130.2 (C-11, C-13), 130.1 (C-12), 129.4 (C-10, C-14), 128.5 (C-8), 121.6 (C-6), 119.1 (C-4a), 40.0 (C-15), 37.6 (C-chex), 33.2 (C-chex), 26.6 (C-chex), 26.4 (C-chex). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 430 [M + 1], 432 [M + 3] **Análisis elemental** (C₂₁H₂₁BrN₂OS): Calculado %C 58.74, %H 4.93, %N 6.52, %S 7.47. Hallado %C 56.85, %H 4.98, %N 6.90, %S 7.02.

8-Cloro-3-fenil-2-neopentiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (26)



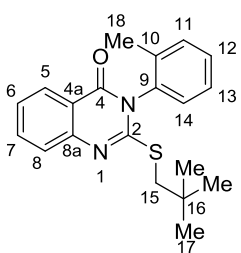
Método A. Reactivos: 8-cloro-3-fenil-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolina (**15**) (0.2 mmol, 50.0 mg), bromuro de neopentilo (0.3 mmol, 0.04 mL), carbonato de cesio (0.6 mmol, 195.5 mg). Agitación bajo irradiación microondas (2 h). Purificación: cromatografía circular centrífuga (acetato de etilo/hexano, 1:16). Rendimiento: sólido amarillo (21.0 mg, 30%). **P.f.** 129-130 °C. **¹H**

RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8.17 (dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1 H, H-5), 7.83 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1 H, H-7), 7.63-7.55 (m, 3 H, H-ar), 7.36-7.30 (m, 3 H, H-6, H-ar), 3.38 (s, 2 H, H-15), 1.04 (s, 9 H, H-17). **¹³C RMN** (100 MHz, CDCl₃): δ 161.7 (C-4), 159.6 (C-2), 144.4 (C-8a), 136.1 (C-9), 135.0 (C-7), 130.9 (C-6), 130.2 (C-12), 130.0 (C-11, C-13), 129.2 (C-10, C-14), 126.2 (C-8), 125.7 (C-5), 121.5 (C-4a), 46.1 (C-15), 32.4 (C-16), 29.0 (C-17). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 359 [M + 1], 361 [M + 3] **Análisis elemental** (C₁₉H₁₉ClN₂OS): Calculado %C 63.59, %H 5.34, %N 7.81, %S 8.93. Hallado %C 63.60, %H 5.51, %N 7.66, %S 8.59.

8-Cloro-2-(3-piridilmetiltio)-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (27)

Método A. Reactivos: 8-cloro-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (**15**) (0.2 mmol, 50.0 mg), hidrobromuro de 3-bromometilpiridina (0.3 mmol, 78.4 mg), carbonato de cesio (0.6 mmol, 395.5 mg). Agitación bajo irradiación microondas (2 h 30 min). Purificación: cromatografía circular centrífuga (acetato de etilo/hexano, 1:5). Rendimiento: sólido blanco (14.3 mg, 22%). **P.f.**

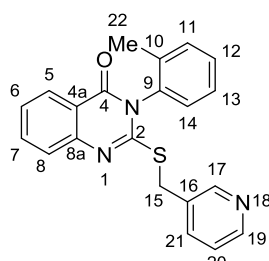
192-193 °C. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃): δ 8.76 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H-17), 8.50 (d, *J* = 4.3 Hz, 1 H, H-19), 8.16 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1 H, H-5), 7.94 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, H-ar), 7.84 (dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1 H, H-ar), 7.59-7.51 (m, 4 H, H-ar), 7.38-7.25 (m, 3 H, H-ar), 4.48 (s, 1 H, H-15). **¹³C RMN** (100 MHz, CDCl₃): δ 161.4 (C-4), 158.0 (C-2), 150.0 (C-ar), 148.0 (C-ar), 147.8 (C-8a), 137.8 (C-ar), 135.5 (C-9), 135.3 (C-7), 133.9 (C-ar), 130.6 (C-ar), 130.4 (C-5), 130.1 (C-ar), 130.0 (C-6), 129.4 (C-ar), 127.6 (C-ar), 126.4 (C-8), 123.9 (C-5), 120.1 (C-4a), 34.0 (C-15). **Pureza por HPLC** >98%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 380 [*M* + 1], 382 [*M* + 3]. **Análisis elemental** (C₂₀H₁₄ClN₃OS): Calculado %C 63.24, %H 3.71, %N 11.06, %S 8.44. Hallado %C 62.40, %H 3.99, %N 11.65, %S 8.01.

3-(2-Metilfenil)-2-neopentiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (28)

Método A. Reactivos: 3-(2-metilfenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (**16**) (0.4 mmol, 100.0 mg), bromuro de neopentilo (0.6 mmol, 0.07 mL), carbonato de cesio (1.2 mmol, 391.0 mg). Agitación bajo irradiación microondas (3 h). Purificación: cromatografía circular centrífuga (acetato de etilo/hexano, 1:10). Rendimiento: sólido amarillo (59.0 mg, 44%). **P.f.** 117-118 °C. **¹H RMN**

(500 MHz, CDCl₃): δ 8.27 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1 H, H-5), 7.76 (ddd, *J* = 8.5, 7.1, 1.6 Hz, 1 H, H-7), 7.65 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1 H, H-ar), 7.47 (td, *J* = 7.4, 1.4 Hz, 1 H, H-ar), 7.45-7.35 (m, 3 H, H-ar), 7.22 (dd, *J* = 7.8, 1.3 Hz, 1 H, H-8), 3.34 (d, *J* = 13.1 Hz, 1 H, H-15), 3.20 (d, *J* = 13.1 Hz, 1 H, H-15), 2.20 (s, 3 H, H-18), 1.01 (s, 9 H, H-17). **¹³C RMN** (125 MHz, CDCl₃): δ 161.6 (C-4), 158.1 (C-2), 148.3 (C-8a), 137.2 (C-9), 135.6 (C-ar), 134.9 (C-7), 131.7 (C-ar), 130.5 (C-5), 129.6 (C-ar), 127.6 (C-ar), 127.7 (C-ar), 126.5 (C-6), 126.0 (C-8), 120.2 (C-4a), 45.7 (C-15), 32.4 (C-16), 29.3 (C-17), 17.8 (C-18). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 339 [*M* + 1]. **Análisis elemental** (C₂₀H₂₂N₂OS): Calculado %C 70.97, %H 6.55, %N 8.28, %S 9.47. Hallado %C 70.95, %H 6.49, %N 8.24, %S 9.28.

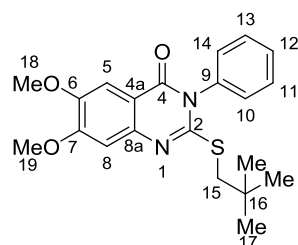
3-(2-Metilfenil)-2-(3-piridilmetiltio)-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (29)



Método B. Reactivos: 3-(2-metilfenil)-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (**16**) (0.4 mmol, 100.0 mg), hidrobromuro de 3-bromometilpiridina (0.6 mmol, 151.7 mg), carbonato de cesio (1.2 mmol, 391.0 mg). Purificación: cromatografía circular centrífuga (acetato de etilo/hexano, 1:6). Rendimiento: sólido blanco (58.0 mg, 41%). **P.f.** 150-151 °C. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃): δ 8.74-8.68 (m,

1 H, H-17), 8.50-8.46 (m, 1 H, H-19), 8.26 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1 H, H-5), 7.81-7.75 (m, 2 H, H-ar), 7.68 (d, 1 H, *J* = 7.6 Hz, H-8), 7.48-7.40 (m, 2 H, H-ar), 7.40-7.31 (m, 2 H, H-ar), 7.28-7.26 (m, 1 H, H-ar), 7.20 (dd, *J* = 7.6, 1.3 Hz, 1 H, H-20), 4.40 (d, *J* = 14.1 Hz, 1 H, H-15), 4.36 (d, *J* = 14.1 Hz, 1 H, H-15), 2.10 (s, 3 H, H-22). **¹³C RMN** (100 MHz, CDCl₃): δ 161.3 (C-4), 156.4 (C-2), 150.1 (C-ar), 148.1 (C-ar), 147.9 (C-8a), 137.6 (C-9), 137.0 (C-ar), 135.1 (C-7), 134.9 (C-ar), 133.8 (C-ar), 131.7 (C-ar), 130.7 (C-5), 129.4 (C-ar), 127.6 (C-ar), 126.4 (C-6), 126.3 (C-8), 123.8 (C-ar), 120.1 (C-4a), 33.8 (C-15), 17.7 (C-22). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 360 [M + 1]. **Análisis elemental** (C₂₁H₁₇N₃OS): Calculado %C 70.17, %H 4.77, %N 11.63, %S 8.92. Hallado %C 69.87, %H 5.02, %N 11.82, %S 8.87.

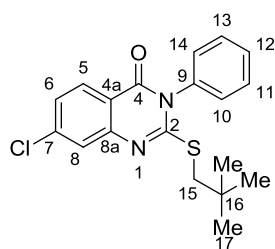
3-Fenil-6,7-dimetoxi-2-neopentiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (30)



Método A. Reactivos: 3-fenil-6,7-dimetoxi-4-oxo-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (**17**) (0.2 mmol, 50.0 mg), bromuro de neopentilo (0.03 mL, 0.2 mmol), carbonato de cesio (0.6 mmol, 195.5 mg). Agitación bajo irradiación microondas (2 h). Purificación: cromatografía circular centrífuga (acetato de etilo/hexano, 1:5). Rendimiento: sólido blanco (12.2 mg, 20%).

P.f. 229-230 °C. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃): δ 7.55 (s, 1 H, H-5), 7.54-7.52 (m, 3 H, H-ar), 7.32-7.28 (m, 2 H, H-ar), 7.07 (s, 1 H, H-8), 4.04 (s, 3 H, OCH₃), 3.97 (s, 3 H, OCH₃), 3.22 (s, 2 H, H-15), 0.99 (s, 9 H, H-17). **¹³C RMN** (100 MHz, CDCl₃): δ 164.8 (C-4), 155.4 (C-2), 148.4 (C-7), 140.5 (C-6), 136.6 (C-8a), 136.2 (C-9), 130.0 (2 C-ar), 129.8, 129.4 (2 C-ar), 106.9 (C-4a), 106.8 (C-5), 106.4 (C-8), 56.7, 56.5 (C-18, C-19), 46.1 (C-15), 32.1 (C-16), 29.2 (C-17). **Pureza por HPLC** >98%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 385 [M + 1]. **Análisis elemental** (C₂₁H₂₄N₂O₃S): Calculado %C 65.60, %H 6.29, %N 7.29, %S 8.34. Hallado %C 65.30, %H 6.66, %N 7.20, %S 8.22.

7-Cloro-3-fenil-2-neopentiltio-4-oxo-3,4-dihidroquinazolina (31)



Método A. Reactivos: 7-cloro-3-fenil-4-oxo-2-tio-1,2,3,4-tetrahidroquinazolina (**18**) (0.2 mmol, 50.0 mg), bromuro de neopentilo (0.3 mmol, 0.03 mL), carbonato de cesio (0.6 mmol, 195.5 mg). Agitación bajo irradiación microondas (2 h 30 min). Purificación: cromatografía en columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:18). Rendimiento: sólido blanco (33.7 mg, 54%). **P.f.**

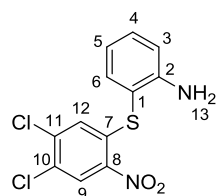
119-121 °C. **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃): δ 8.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H-5), 7.65 (d, *J* = 1.8 Hz, 1 H, H-8), 7.60-7.49 (m, 1 H, H-ar), 7.42-7.28 (m, 4 H, H-ar), 7.21-7.08 (m, 1 H, H-ar), 3.22 (s, 2 H, H-15), 0.94 (s, 9 H, H-17). **¹³C RMN** (100 MHz, CDCl₃): δ 161.4 (C-4), 159.5 (C-2), 148.4 (C-8a), 141.6 (C-7), 140.8 (C-9), 130.0 (C-5), 129.7 (C-6), 129.4 (C-ar), 129.0 (C-ar), 128.2 (C-ar), 125.1 (C-8), 114.8 (C-4a), 45.9 (C-15), 31.9 (C-16), 28.9 (C-17). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 359 [M + 1], 361 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₉H₁₉ClN₂OS): Calculado %C 63.59, %H 5.34, %N 7.81, %S 8.93. Hallado %C 63.61, %H 5.28, %N 7.56, %S 8.79.

1.3. Síntesis de derivados de sulfuro

Método A

Sobre una disolución del ariltiol (1 equiv) y del haluro de arilo (1.2 equiv) correspondientes en diclorometano anhidro, se añade el carbonato de potasio (5 equiv), agitándose la mezcla de reacción bajo irradiación microondas durante el tiempo y la temperatura indicados en cada caso. A continuación, se evapora el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se lava con una disolución de NaCl saturado. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico anhidro, y se purifica por cromatografía en columna flash o automática usando el equipo IsoleraOne, empleando las mezclas de eluyentes indicadas en cada caso, obteniéndose así el producto deseado.

2-(4,5-Dicloro-2-nitrofeniltio)anilina (32)

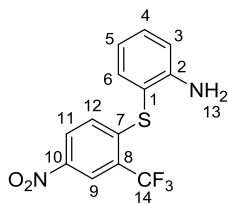


Reactivos: 2-aminotiofenol (1.2 mmol, 150.0 mg), 1,2-dicloro-4-fluoro-5-nitrobenzene (1.4 mmol, 300.4 mg), carbonato potásico (6.0 mmol, 826.7 mg). Agitación bajo irradiación microondas (80 °C, 1 h 30 min). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:4).

Rendimiento: sólido naranja (196.0 mg, 52%). **P.f.** 158-159 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.51 (s, 1 H, H-9), 7.35 (dd, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1 H, H-6), 7.29 (ddd, *J* = 8.1, 7.2, 1.6 Hz, 1 H, H-4), 6.84 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1 H, H-3), 6.74 (s, 1 H, H-12), 6.65

(ddd, $J = 7.7, 7.2, 1.2$ Hz, 1 H, H-5), 5.65 (s, 2 H, H-13). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ 151.6 (C-2), 144.8 (C-8), 138.7 (C-11), 138.2 (C-7), 138.1 (C-6), 133.5 (C-4), 128.5 (C-9), 128.3 (C-10), 128.2 (C-12), 117.7 (C-5), 116.1 (C-3), 109.0 (C-1). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (EI) (m/z): 315 [M], 317 [M + 2]. **Análisis elemental** ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) Calculado: %C 45.73, %H 2.56, %N 8.89, %S 10.17. Hallado: %C 45.99, %H 2.51, %N 9.02, %S 10.20.

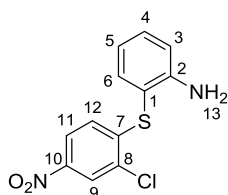
2-[2-(Trifluorometil)-4-nitrofeniltio]anilina (33)



Reactivos: 2-aminotiofenol (1.2 mmol, 150.0 mg), 1-cloro-4-nitro-2-(trifluorometil)benceno (1.4 mmol, 324.3 mg), carbonato potásico (6.0 mmol, 826.7 mg). Agitación bajo irradiación microondas (80 °C, 1 h 30 min). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:4).

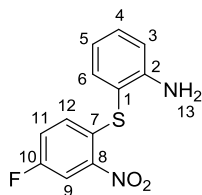
Rendimiento: sólido naranja (243.8 mg, 65%). **P.f.** 105-106 °C. ^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8.41 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, H-9), 8.33 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1 H, H-11), 7.33 (dd, $J = 7.4, 1.5$ Hz, 1 H, H-6), 7.30 (ddd, $J = 8.0, 7.4, 1.5$ Hz, 1 H, H-4), 6.94 (dd, $J = 8.8$ Hz, 1 H, H-12), 6.90 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1 H, H-3), 6.65 (td, $J = 7.4, 1.3$ Hz, 1 H, H-5), 5.57 (s, 2 H, H-13). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ 152.0 (C-2), 147.3 (C-10), 145.2 (m, C-7), 138.3 (C-6), 133.6 (C-4), 128.4 (C-11), 128.1 (C-12), 126.1 (q, $J = 32.4$ Hz) (C-8), 123.8 (q, $J = 274.3$ Hz, C-14), 123.0 (q, $J = 5.9$ Hz, C-9), 118.2 (C-5), 116.5 (C-3), 107.9 (C-1). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (m/z): 315 [M + 1]. **Análisis elemental** ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) Calculado: %C 49.68, %H 2.89, %N 8.91, %S 10.20. Hallado: %C 49.71, %H 3.02, %N 9.04, %S 10.45.

2-(2-Cloro-4-nitrofeniltio)anilina (34)



Reactivos: 2-aminotiofenol (1.2 mmol, 150.0 mg), 2-cloro-1-fluoro-4-nitrobenceno (1.4 mmol, 252.4 mg), carbonato de potasio (6.0 mmol, 826.7 mg). Agitación bajo irradiación microondas (80 °C, 1 h 30 min). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:4).

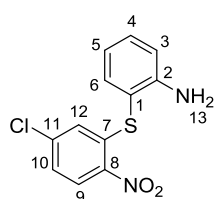
Rendimiento: sólido naranja (133.7 mg, 40%). **P.f.** 128-129 °C. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8.24 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, H-9), 7.90 (dd, $J = 8.9, 2.3$ Hz, 1 H, H-11), 7.44 (ddd, $J = 7.8, 1.6, 0.5$ Hz, 1 H, H-6), 7.36 (ddd, $J = 8.2, 7.3, 1.6$ Hz, 1 H, H-4), 6.94-6.77 (m, 2 H, H-3, H-5), 6.71 (d, $J = 8.9$ Hz, 1 H, H-12), 4.29 (s, 1 H, H-13). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 149.7 (C-2), 146.5 (C-10), 145.7 (C-7), 138.1 (C-6), 133.1 (C-4), 131.2 (C-8), 126.1 (C-12), 125.0 (C-9), 122.4 (C-11), 119.8 (C-5), 116.2 (C-3), 110.7 (C-1). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (m/z): 281 [M + 1], 283 [M + 3]. **Análisis elemental** ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$) Calculado: %C 51.34, %H 3.23, %N 9.98, %S 11.42. Hallado: %C 51.55, %H 3.40, %N 10.09, %S 11.63.

2-(4-Fluoro-2-nitrofeniltio)anilina (35)

Reactivos: 2-aminotiofenol (1.2 mmol, 150.0 mg), 1,4-difluoro-2-nitrobenceno (1.4 mmol, 228.8 mg), carbonato de potasio (6.0 mmol, 826.7 mg). Agitación bajo irradiación microondas (80 °C, 1 h 30 min).

Purificación: columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:9). Rendimiento: sólido naranja (162.1 mg, 51%). **P.f.** 71-72 °C (lit.¹⁵⁹ 73-74 °C) **¹H RMN**

(300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.14 (dd, *J* = 8.8, 2.8 Hz, 1 H, H-9), 7.53 (ddd, *J* = 9.1, 7.8, 2.9 Hz, 1 H, H-11), 7.34 (dd, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1 H, H-6), 7.25 (ddd, *J* = 8.2, 7.2, 1.6 Hz, 1 H, H-4), 6.81 (ddd, *J* = 8.1, 1.4, 0.4 Hz, 1 H, H-3), 6.76 (dd, *J* = 9.1, 5.3 Hz, 1 H, H-12), 6.63 (ddd, *J* = 7.7, 7.2, 1.4 Hz, 1 H, H-5), 5.56 (s, 2 H, H-13). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 159.5 (d, *J* = 248.8 Hz, C-10), 148.6 (C-2), 145.3 (d, *J* = 7.9 Hz, C-8), 137.9 (C-6), 132.8 (C-7), 132.5 (C-4), 128.9 (d, *J* = 7.3 Hz, C-12), 121.7 (d, *J* = 21.9 Hz, C-11), 119.9 (C-5), 116.2 (C-3), 113.1 (d, *J* = 26.7 Hz, C-9), 112.7 (C-1). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 265 [*M* + 1]. **Análisis elemental** (C₁₂H₉FN₂O₂S) Calculado: %C 54.54, %H 3.43, %N 10.60, %S 12.13. Hallado: %C 54.83, %H 3.67, %N 10.77, %S 12.40.

2-(5-Cloro-2-nitrofeniltio)anilina (36)

Reactivos: 2-aminotiofenol (1.6 mmol, 200.0 mg), 2,4-dicloro-1-nitrobenceno (1.9 mmol, 368.0 mg), carbonato de potasio (6.0 mmol, 828.0 mg). Agitación bajo irradiación microondas (80 °C, 1 h 30 min).

Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:9).

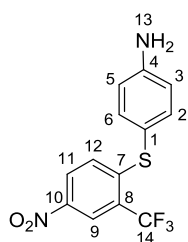
Rendimiento: sólido naranja (224.0 mg, 50%). **P.f.** 134-135 °C (lit.¹⁶⁰

132-133 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.28 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H-9), 7.42 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1 H, H-11), 7.34 (dd, *J* = 7.5, 1.6 Hz, 1 H, H-6), 7.28 (ddd, *J* = 8.2, 7.5, 1.6 Hz, 1 H, H-4), 6.84 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1 H, H-3), 6.67 (dd, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1 H, H-5), 6.63 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H, H-12), 5.63 (s, 2 H, H-13). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 150.8 (C-2), 143.7 (C-8), 139.5 (C-7), 139.2 (C-11), 137.3 (C-6), 132.5 (C-4), 128.0 (C-9), 125.6 (C-12), 125.3 (C-10), 116.9 (C-5), 115.2 (C-3), 108.6 (C-1). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 281 [*M* + 1], 283 [*M* + 3]. **Análisis elemental** (C₁₂H₉ClN₂O₂S) Calculado: %C 51.34, %H 3.23, %N 9.98, %S 11.42. Hallado: %C 51.28, %H 3.31, %N 9.89, %S 11.65.

¹⁵⁹ Roe, A.; Little, W. F. "The preparation of some fluorophenothiazine and trifluoromethylphenothiazine, and some observations regarding determination of their structure by infrared spectroscopy" *J. Org. Chem.* **1955**, 20, 1577-1590.

¹⁶⁰ Galbreath, R. J.; Ingham, R. K. "Synthesis of 2-chlorophenothiazine via a smiles rearrangement" *J. Org. Chem.* **1958**, 23, 1804-1806.

4-[2-(Trifluorometil)-4-nitrofeniltio]anilina (37)



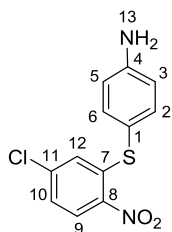
Reactivos: 4-aminotiofenol (1.2 mmol, 150.0 mg), 1-cloro-4-nitro-2-(trifluorometil)benceno (1.4 mmol, 324.3 mg), carbonato de potasio (6.0 mmol, 826.7 mg). Agitación bajo irradiación microondas (100 °C, 45 min).

Purificación: columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:9). Rendimiento: sólido naranja (197.0 mg, 53%). **P.f.** 95-96 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-

*d*₆): δ 8.37 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, H-9), 8.30 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1 H, H-11), 7.23 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-2, H-6), 7.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H-12), 6.70 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-3, H-5), 5.83 (s, 2 H, H-13). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 150.8 (C-4), 148.6 (C-10), 144.0 (C-7), 137.7 (C-6), 127.7 (C-12), 126.3 (q, *J* = 32.4 Hz, C-8), 122.7 (q, *J* = 274.6 Hz, C14), 122.2 (q, *J* = 6.0 Hz, C-9), 116.4 (C-3), 115.1 (C-1). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 315 [M + 1]. **Análisis elemental** (C₁₃H₉F₃N₂O₂S) Calculado: %C 49.68, %H 2.89, %N 8.91, %S 10.20. Hallado: %C 49.85, %H 3.02, %N 9.12, %S 10.01.

4-(5-Cloro-2-nitrofeniltio)anilina (39) y 4-(3-Cloro-4-nitrofeniltio)anilina (40)

Reactivos: 4-aminotiofenol (1.6 mmol, 200.0 mg), 2,4-dicloro-1-nitrobenceno (1.9 mmol, 368.1 mg), carbonato de potasio (8.0 mmol, 1103.0 mg). Agitación bajo irradiación microondas (100 °C, 45 min). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:4). La mezcla de isómeros obtenida se separa por HPLC semipreparativo empleando como eluyentes metanol/acetonitrilo 3:4.

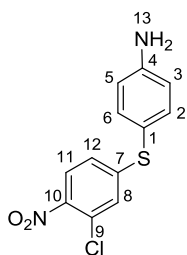


Primera fracción (39) Rendimiento: sólido amarillo (34.1 mg, 8%). **P.f.**

113-114 °C (lit.¹⁶¹ 109-111 °C). **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.22 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H-9), 7.36 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1 H, H-10), 7.21 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-2, H-6), 6.69 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-3, H-5), 6.66 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H, H-12), 5.76 (s, 2 H, H-13). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 152.0 (C-

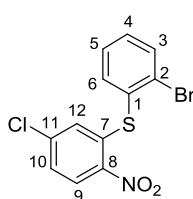
4), 144.2 (C-7), 143.2 (C-8), 140.2 (C-11), 137.9 (C-2), 128.5 (C-9), 126.8 (C-12), 125.9 (C-10), 116.0 (C-5), 112.1 (C-1). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 281 [M + 1], 283 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₃H₉ClN₂O₂S) Calculado: %C 51.34, %H 3.23, %N 9.98, %S 11.42. Hallado: %C 51.37, %H 3.39, %N 10.15, %S 11.26.

¹⁶¹ Youssef, M. S. K.; Elezbawy, S. R.; Abdelwahab, A. A. "Synthesis of new 4-*N*-thienylidenamino and 4-*N*-furfurylideneamino diaryl sulfides and sulfones" *Acta Pharm. Jugosl.* **1981**, 31, 67-70.



Segunda fracción (40) Rendimiento: sólido amarillo (15.8 mg, 4%). **P.f.** 129-130 °C. **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.94 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, H-12), 7.19 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-2, H-6), 7.12 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, H-8), 7.03 (dd, *J* = 8.7, 2.0 Hz, 1 H, H-12), 6.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-3, H-5), 5.72 (s, 2H, H-13). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 151.8 (C-4), 151.0 (C-7), 144.0 (C-10), 137.7 (C-2), 127.5 (C-9), 127.2 (C-11), 126.9 (C-12), 124.5 (C-8), 115.8 (C-3), 111.3 (C-1). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 281 [M + 1], 283 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₃H₉ClN₂O₂S) Calculado: %C 51.34, %H 3.23, %N 9.98, %S 11.42. Hallado: %C 51.45, %H 3.40, %N 10.13, %S 11.33.

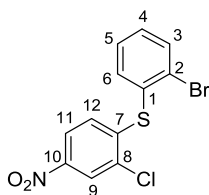
2-Bromofenil 5-cloro-2-nitrofenil sulfuro (41)



Reactivos: 2-bromotiofenol (0.8 mmol, 150.0 mg), 2,5-dicloronitrobenzoceno (1.0 mmol, 182.8 mg), carbonato de potasio (4.0 mmol, 547.2 mg). Agitación bajo irradiación microondas (80 °C, 1 h 30 min). Purificación: columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:9). Rendimiento: sólido amarillo (96.0 mg, 36%). **P.f.** 100-101 °C. **¹H RMN**

(300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.32 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, H-9), 7.93 (dd, *J* = 7.6, 1.8 Hz, 1 H, H-3), 7.85 (dd, *J* = 7.6, 1.9 Hz, 1 H, H-6), 7.58 (dd, *J* = 7.6, 1.8 Hz, 1 H, H-5), 7.55 (dd, *J* = 7.6, 1.9 Hz, 1 H, H-4), 6.57 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, H-12). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 143.5 (C-8), 139.7 (C-7), 138.2 (C-6), 138.1 (C-11), 134.5 (C-3), 133.1 (C-4), 130.4 (C-1), 129.9 (C-5), 128.2 (C-9), 128.1 (C-2), 126.5 (C-10, C-12). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (EI) (*m/z*): 344 [M], 346 [M + 2]. **Análisis elemental** (C₁₂H₇BrClNO₂S) Calculado: %C 41.82, %H 2.05, %N 4.06, %S 9.30. Hallado: %C 41.59, %H 1.90, %N 4.17, %S 9.46.

2-Bromofenil 2-cloro-4-nitrofenil sulfuro (42)

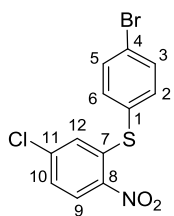


Reactivos: 2-bromotiofenol (0.8 mmol, 150.0 mg), 3-cloro-4-fluoronitrobenzoceno (1.0 mmol, 166.8 mg), carbonato de potasio (4.0 mmol, 547.2 mg). Agitación bajo irradiación microondas (80 °C, 1 h 30 min). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:9).

Rendimiento: sólido amarillo (120.0 mg, 40%). **P.f.** 91-92 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.36 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, H-9), 8.09 (dd, *J* = 8.8, 2.5 Hz, 1 H, H-11), 7.93 (dd, *J* = 7.0, 2.3 Hz, 1 H, H-3), 7.76 (dd, *J* = 7.0, 2.3 Hz, 1 H, H-6), 7.61-7.49 (m, 2 H, H-4, H-5), 6.79 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H-12). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 145.6 (C-10), 144.5 (C-7), 137.4 (C-6), 134.4 (C-3), 132.7 (C-4 o C-5), 130.0 (C-8), 129.7 (C-4 o C-5), 129.4 (C-1), 129.3 (C-2), 127.2 (C-12), 124.6 (C-9), 123.0 (C-11). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (EI) (*m/z*): 344 [M], 346 [M + 2]. **Análisis elemental** (C₁₂H₇BrClNO₂S)

Calculado: %C 41.82, %H 2.05, %N 4.06, %S 9.30. Hallado: %C 41.88, %H 1.76, %N 4.30, %S 9.19.

4-Bromofenil 5-cloro-2-nitrofenil sulfuro (43)



Reactivos: 4-bromotiofenol (1.1 mmol, 200.0 mg), 2,4-dicloro-1-nitrobenzoceno (1.3 mmol, 243.7 mg), carbonato de potasio (5.3 mmol, 730.0 mg). Agitación bajo irradiación microondas (80 °C, 1 h 30 min).

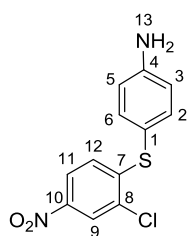
Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:4).

Rendimiento: sólido amarillo (114.4 mg, 32%). **P.f.** 131-132 °C (lit.¹⁶² 127.7-128.6 °C) **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.27 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, H-9), 7.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-3, H-5), 7.59 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-2, H-6), 7.49 (dd, *J* = 8.9, 2.2 Hz, 1 H, H-10), 6.74 (d, *J* = 2.2 Hz, 1 H, H-12). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 143.5 (C-8), 139.5 (C-11), 139.4 (C-7), 137.4 (C-2, C-6), 133.6 (C-3, C-5), 129.1 (C-1), 127.9 (C-9), 127.1 (C-12), 126.3 (C-10), 124.6 (C-4). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (EI) (*m/z*): 344 [M], 346 [M + 2]. **Análisis elemental** (C₁₂H₇BrClNO₂S) Calculado: %C 41.82, %H 2.05, %N 4.06, %S 9.30. Hallado: %C 41.98, %H 1.84, %N 4.18, %S 9.53.

Método B

Sobre una disolución del ariltiol (1 equiv) y del haluro de arilo (1 equiv) correspondientes en etanol, se añade el acetato de sodio (1.5 equiv), agitándose la mezcla de reacción bajo irradiación microondas durante el tiempo y la temperatura indicados en cada caso. A continuación, se evapora el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se lava con una disolución de NaCl saturado. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico anhidro, y se purifica por cromatografía en columna flash o automática usando el equipo IsoleraOne, empleando las mezclas de eluyentes indicadas en cada caso, obteniéndose así el producto deseado.

4-(2-Cloro-4-nitrofeniltio)anilina (38)



Reactivos: 4-aminotiofenol (0.8 mmol, 100.0 mg), 2-cloro-1-fluoro-4-nitrobenzoceno (0.8 mmol, 149.6 mg), acetato de sodio (1.2 mmol, 98.4 mg). Agitación bajo irradiación microondas (85 °C, 90 min). Purificación:

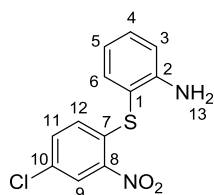
columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:4). Rendimiento: sólido

naranja (202.0 mg, 50%). **P.f.** 138-139 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.26 (d, *J* = 2.6 Hz, 1 H, H-9), 8.05 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1 H, H-11), 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 2

¹⁶² Breitenstein, W.; Marki, F.; Roggo, S.; Wiesenberger, I.; Pfeilschifter, J.; Furet, P.; Beriger, E. "A new class of inhibitors of secretory phospholipase A(2)-enolized 1,3-dioxane-4,6-dione-5-carboxamides" *Eur. J. Med. Chem.* **1994**, 29, 649-658.

H, H-2, H-6), 6.75 (d, $J = 8.9$ Hz, 1 H, H-12), 6.70 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H, H-3, H-5), 5.79 (s, 2 H, H-13). **^{13}C RMN** (75 MHz, DMSO- d_6): δ 151.0 (C-4), 149.7 (C-7), 144.2 (C-10), 136.8 (C-2), 127.9 (C-8), 125.4 (C-12), 123.8 (C-9), 122.3 (C-11), 115.0 (C-5), 109.4 (C-1). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (m/z): 281 [M + 1], 283 [M + 3]. **Análisis elemental** ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$) Calculado: %C 51.34, %H 3.23, %N 9.98, %S 11.42. Hallado: %C 51.22, %H 3.50, %N 9.94, %S 11.71.

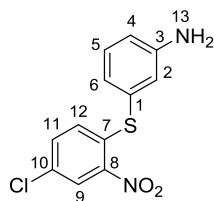
2-(4-Cloro-2-nitrofeniltio)anilina (44)



Reactivos: 2-aminotiofenol (1.6 mmol, 200.0 mg), 2,5-dicloronitrobenceno (1.6 mmol, 306.8 mg), acetato de sodio (2.4 mmol, 232.5 mg). Agitación bajo irradiación microondas (85 °C, 2 h). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 3:7). Rendimiento: sólido amarillo (268.1 mg, 60%). **P.f.** 121-122 °C (lit.¹⁶³

122 °C). **^1H RMN** (300 MHz, DMSO- d_6): δ 8.28 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, H-9), 7.65 (dd, $J = 8.8$, 2.1 Hz, 1 H, H-11), 7.34 (dd, $J = 7.7$, 1.6 Hz, 1 H, H-6), 7.25 (ddd, $J = 8.2$, 7.2, 1.6 Hz, 1 H, H-4), 6.81 (dd, $J = 8.2$, 1.3 Hz, 1 H, H-3), 6.74 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H, H-12), 6.63 (ddd, $J = 7.7$, 7.2, 1.3 Hz, 1 H, H-5), 5.57 (s, 2 H, H-13). **^{13}C RMN** (75 MHz, DMSO- d_6): δ 150.8 (C-2), 145.4 (C-8), 137.3 (C-6), 136.1 (C-7), 133.8 (C-4), 132.3 (C-11), 129.3 (C-10), 128.4 (C-9), 125.4 (C-12), 116.7 (C-5), 115.1 (C-3), 108.8 (C-1). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (m/z): 281 [M + 1], 283 [M + 3]. **Análisis elemental** ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$) Calculado: %C 51.34, %H 3.23, %N 9.98, %S 11.42. Hallado: %C 51.09, %H 3.08, %N 9.82, %S 11.35.

3-(4-Cloro-2-nitrofeniltio)anilina (45)

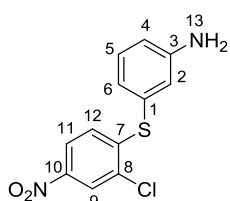


Reactivos: 3-aminotiofenol (1.2 mmol, 150.0 mg), 2,5-dicloronitrobenceno (1.2 mmol, 230.4 mg), acetato de sodio (1.8 mmol, 174.6 mg). Agitación bajo irradiación microondas (85 °C, 2 h). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:9). Rendimiento: sólido naranja (124.8 mg, 32%). **P.f.** 96-97 °C (lit.¹⁶⁴ 94 °C).

¹⁶³ Sharma, H. L.; Sharma, V. N.; Mital, R. L. "Studies on synthesis of nitrophenothiazines by smiles rearrangement behaviour of halonitrobenzenes with o-aminothiophenol" *Tetrahedron Lett.* **1967**, 1657-1662.

¹⁶⁴ Girault, S.; Baillet, S.; Horvath, D.; Lucas, V.; Davioud-Charvet, E.; Tartar, A.; Sergheraert, C. "New potent inhibitors of trypanothione reductase from Trypanosoma cruzi in the 2-aminodiphenylsulfide series" *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, 32, 39-52.

3-(2-Cloro-4-nitrofeniltio)anilina (46)



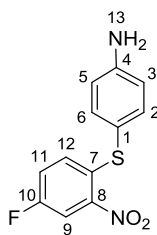
Reactivos: 3-aminotiofenol (1.6 mmol, 200.0 mg), 3-cloro-4-fluoronitrobenzoceno (1.6 mmol, 280.8 mg), acetato de sodio (2.4 mmol, 232.8 mg). Agitación bajo irradiación microondas (85 °C, 2 h).

Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:4).

Rendimiento: sólido naranja (344.3 mg, 77%). **P.f.** 123-124 °C. **¹H**

RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.29 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H-9), 8.08 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1 H, H-11), 7.20 (t, *J* = 7.7 Hz, 1 H, H-5), 6.90 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, H-12), 6.76 (t, *J* = 1.9 Hz, 1 H, H-2), 6.75-6.69 (m, 2 H, H-3, H-6), 5.49 (s, 2 H, H-13). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 150.6 (C-3), 147.8 (C-7), 144.9 (C-10), 131.0 (C-5), 129.0 (C-1), 127.7 (C-8), 126.5 (C-12), 124.2 (C-9), 122.8 (C-11), 121.7 (C-4 o C-6), 119.5 (C-2), 115.9 (C-4 o C-6). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 281 [M + 1], 283 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₂H₉ClN₂O₂S) Calculado: %C 51.34, %H 3.23, %N 9.98, %S 11.42. Hallado: %C 51.62, %H 3.42, %N 10.20, %S 11.71.

4-(4-Fluoro-2-nitrofeniltio)anilina (47)

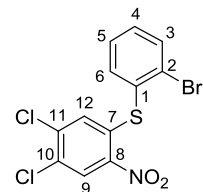


Reactivos: 4-aminotiofenol (2.0 mmol, 250.0 mg), 1,4-difluoro-2-nitrobenzoceno (2.0 mmol, 317.7 mg), acetato de sodio (3.0 mmol, 246.0 mg).

Agitación bajo irradiación microondas (85 °C, 1 h 30 min). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:4). Rendimiento: sólido naranja (283.6 mg, 54%). **P.f.** 124-125 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ

8.11 (dd, *J* = 8.7, 2.9 Hz, 1 H, H-9), 7.54 (ddd, *J* = 9.0, 7.8, 2.9 Hz, 1 H, H-11), 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-2, H-6), 6.87 (dd, *J* = 9.0, 5.3 Hz, 1 H, H-12), 6.69 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-3, H-5), 5.74 (s, 2 H, H-13). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 151.5 (C-4), 141.8 (d, *J* = 276 Hz, C-10), 137.6 (C-6), 136.9 (d, *J* = 11.7 Hz, C-8), 129.8 (C-7), 129.7 (d, *J* = 7.8 Hz, C-12), 122.5 (d, *J* = 22.4 Hz, C-11), 115.6 (C-5), 112.9 (d, *J* = 27.0 Hz, C-9), 112.5 (C-1). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 265 [M + 1]. **Análisis elemental** (C₁₂H₉FN₂O₂S) Calculado: %C 54.54, %H 3.43, %N 10.60, %S 12.13. Hallado: %C 54.49, %H 3.48, %N 10.41, %S 11.87.

2-Bromofenil 4,5-dicloro-2-nitrofenil sulfuro (49)



Reactivos: 2-bromotiofenol (0.8 mmol, 150.0 mg), 1,2-dicloro-4-fluoro-5-nitrobenzoceno (0.8 mmol, 166.5 mg), acetato de sodio (1.2 mmol, 115.4 mg). Agitación bajo irradiación microondas (85 °C, 1 h 30 min).

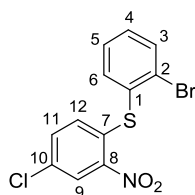
Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:10).

Rendimiento: sólido amarillo (49.2 mg, 17%). **P.f.** 156-157 °C. **¹H RMN**

(300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.57 (s, 1 H, H-9), 7.93 (dd, *J* = 7.2, 1.2 Hz, 1 H, H-3), 7.83 (dd, *J*

= 7.2, 1.6 Hz, 1 H, H-6), 7.68-7.42 (m, 2 H, H-4, H-5), 6.78 (s, 1 H, H-12). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 143.9 (C-8), 137.8 (C-6), 137.7 (C-11), 136.0 (C-7), 134.4 (C-3), 133.0 (C-4 o C-5), 130.2 (C-1), 129.8 (C-12), 129.4 (C-10), 128.8 (C-2), 128.5 (C-9), 127.8 (C-4 o C-5). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 379 [M], 381 [M + 2]. **Análisis elemental** (C₁₂H₆BrCl₂NO₂S) Calculado: %C 38.02, %H 1.60, %N 3.70, %S 8.46. Hallado: %C 37.93, %H 1.56, %N 3.72, %S 8.41.

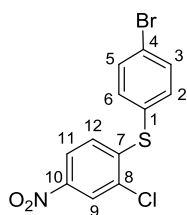
2-Bromofenil 4-cloro-2-nitrofenil sulfuro (50)



Reactivos: 2-bromotiofenol (0.8 mmol, 150.0 mg), 2,5-dicloronitrobenceno (0.8 mmol, 152.3 mg), acetato de sodio (1.2 mmol, 115.4 mg). Agitación bajo irradiación microondas (85 °C, 1 h 30 min). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:9). Rendimiento: sólido amarillo (199.4 mg, 70%). **P.f.** 85-86 °C. **¹H RMN**

(300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.33 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H-9), 7.89 (dd, *J* = 7.4, 1.8 Hz, 1 H, H-3), 7.80 (dd, *J* = 7.4, 2.0 Hz, 1 H, H-6), 7.70 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1 H, H-11), 7.56 (dd, *J* = 7.4, 1.8 Hz, 1 H, H-5), 7.51 (dd, *J* = 7.4, 2.0 Hz, 1 H, H-4), 6.78 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H-12). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 145.5 (C-8), 137.7 (C-6), 134.4 (C-7), 134.3 (C-11), 134.2 (C-3), 132.6 (C-4), 130.8 (C-1), 130.6 (C-10), 129.7 (C-5), 129.6 (C-12), 129.5 (C-2), 125.5 (C-9). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 344 [M], 346 [M + 2]. **Análisis elemental** (C₁₂H₇BrClNO₂S) Calculado: %C 41.82, %H 2.05, %N 4.06, %S 9.30. Hallado: %C 41.59, %H 1.98, %N 4.24, %S 9.19.

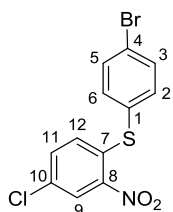
4-Bromofenil 2-cloro-4-nitrofenil sulfuro (51)



Reactivos: 4-bromotiofenol (1.1 mmol, 200.0 mg), 3-cloro-4-fluoronitrobenceno (1.1 mmol, 185.7 mg), acetato de sodio (1.6 mmol, 153.9 mg). Agitación bajo irradiación microondas (85 °C, 1 h 30 min). Purificación: columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:9). Rendimiento: sólido amarillo (216.4 mg, 57%). **P.f.** 127-128 °C. **¹H RMN** (300 MHz,

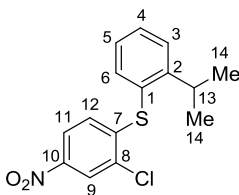
DMSO-*d*₆): δ 8.34 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, H-9), 8.06 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1 H, H-11), 7.78 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-3, H-5), 7.58 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-2, H-6), 6.90 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, H-12). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 146.1 (C-7), 145.3 (C-10), 137.1 (C-2), 133.6 (C-3), 129.6 (C-8), 127.7 (C-1), 127.2 (C-12), 124.4 (C-4, C-9), 122.9 (C-11). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 344 [M], 346 [M + 2]. **Análisis elemental** (C₁₂H₇BrClNO₂S) Calculado: %C 41.82, %H 2.05, %N 4.06, %S 9.30. Hallado: %C 41.76, %H 1.83, %N 4.25, %S 9.55.

4-Bromofenil 4-cloro-2-nitrofenil sulfuro (52)



Reactivos: 4-bromotifenol (1.1 mmol, 200.0 mg), 2,5-dicloronitrobenzoceno (1.1 mmol, 211.2 mg), acetato de sodio (1.6 mmol, 131.2 mg). Agitación bajo irradiación microondas (85 °C, 1 h 30 min). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:9). Rendimiento: sólido amarillo (310.0 mg, 85%). **P.f.** 155-156 °C. (lit.¹⁶⁵ 155 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.29 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H-9), 7.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H, H-3, H-5), 7.67 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1 H, H-11), 7.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H, H-2, H-6), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H-12). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 145.9 (C-8), 137.5 (C-2), 135.9 (C-7), 134.6 (C-11), 133.8 (C-3), 130.8 (C-1), 130.6 (C-12), 129.9 (C-10), 125.7 (C-9), 124.6 (C-4). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 344 [M], 346 [M + 2]. **Análisis elemental** (C₁₂H₇BrClNO₂S) Calculado: %C 41.82, %H 2.05, %N 4.06, %S 9.30. Hallado: %C 42.10, %H 1.97, %N 4.28, %S 9.57.

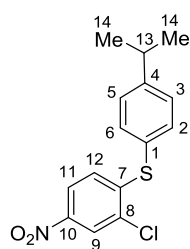
2-Cloro-4-nitrofenil 2-isopropilfenil sulfuro (53)



Reactivos: 2-isopropiltiofenol (0.7 mmol, 100.0 mg), 3-cloro-4-fluoronitrobenzoceno (0.7 mmol, 115.3 mg), acetato de sodio (1.0 mmol, 93.1 mg). Agitación bajo irradiación microondas (85 °C, 1 h 30 min). Purificación: acetato de etilo/hexano (1:40). Rendimiento: aceite marrón (143.6 mg, 48%). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.34 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, H-9), 8.07 (dd, *J* = 8.9, 2.5 Hz, 1 H, H-11), 7.66-7.61 (m, 2 H, H-4, H-6), 7.59 (dd, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1 H, H-3), 7.43-7.39 (m, 1 H, H-5), 6.64 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, H-12), 3.34 (hept, *J* = 6.9 Hz, 1 H, H-13), 1.16 (d, *J* = 6.9 Hz, 6 H, H-14). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 153.2 (C-2), 147.7 (C-7), 145.3 (C-10), 137.4 (C-3), 132.2 (C-4 o C-6), 129.5 (C-8), 128.4 (C-5), 127.9 (C-4 o C-6), 126.5 (C-12), 126.3 (C-1), 124.7 (C-9), 123.2 (C-11), 31.1 (C-13), 23.9 (C-14). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (EI) (*m/z*): 307 [M], 309 [M + 2]. **Análisis elemental** (C₁₅H₁₄ClNO₂S) Calculado: %C 58.53, %H 4.58, %N 4.55, %S 10.42. Hallado: %C 58.82, %H 4.76, %N 4.49, %S 10.23.

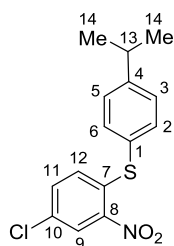
¹⁶⁵ Stump, B.; Kaiser, M.; Brun, R.; Krauth-Siegel, R.L.; Diederich, F. "Betraying the parasite's redox system: diaryl sulfide-based inhibitors of trypanothione reductase: subversive substrates and antitrypanosomal properties" *ChemMedChem* **2007**, 2, 1708-1712.

2-Cloro-4-nitrofenil 4-isopropilfenil sulfuro (54)



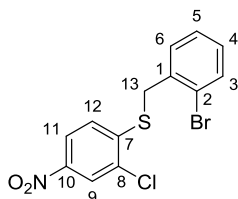
Reactivos: 4-isopropiltiofenol (0.7 mmol, 100.0 mg), 3-cloro-4-fluoronitrobenceno (0.7 mmol, 115.3 mg), acetato de sodio (1.0 mmol, 93.1 mg). Agitación bajo irradiación microondas (85 °C, 1 h 30 min). Purificación: columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:60). Rendimiento: sólido amarillo pálido (57.4 mg, 30%). **P.f.** 71-72 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.32 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H-9), 8.07 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1 H, H-11), 7.56 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H, H-2, H-6), 7.46 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H, H-3, H-5), 6.80 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, H-12), 2.98 (hept, *J* = 6.9 Hz, 1 H, H-13), 1.24 (d, *J* = 6.9 Hz, 6 H, H-14). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 151.3 (C-4), 147.5 (C-7), 145.0 (C-10), 135.5 (C-6), 129.0 (C-8), 128.7 (C-3), 126.3 (C-12), 124.6 (C-1), 124.3 (C-9), 122.9 (C-11), 33.2 (C-13), 23.5 (C-14). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (EI) (*m/z*): 307 [M], 309 [M + 2]. **Análisis elemental** (C₁₅H₁₄ClNO₂S) Calculado: %C 58.53, %H 4.58, %N 4.55, %S 10.42. Hallado: %C 58.51, %H 4.78, %N 4.41, %S 10.27.

4-Cloro-2-nitrofenil 4-isopropilfenil sulfuro (55)



Reactivos: 4-isopropiltiofenol (0.7 mmol, 100.0 mg), 2,5-dicloronitrobenceno (0.7 mmol, 125.9 mg), acetato de sodio (1.0 mmol, 95.5 mg). Agitación bajo irradiación microondas (85 °C, 1 h 30 min). Purificación: columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:60). Rendimiento: sólido amarillo (117.1 mg, 60%). **P.f.** 108-109 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.29 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H-9), 7.68 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1 H, H-11), 7.53 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H, H-2, H-6), 7.43 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H, H-3, H-5), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H-12), 2.97 (hept, *J* = 6.9 Hz, 1 H, H-13), 1.23 (d, *J* = 6.9 Hz, 6 H, H-14). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 151.0 (C-4), 145.0 (C-8), 136.9 (C-7), 135.4 (C-2), 134.1 (C-11), 129.9 (C-10), 128.5 (C-3), 125.2 (C-9), 33.2 (C-13), 23.5 (C-14). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (EI) (*m/z*): 307 [M], 309 [M + 2]. **Análisis elemental** (C₁₅H₁₄ClNO₂S) Calculado: %C 58.53, %H 4.58, %N 4.55, %S 10.42. Hallado: %C 58.74, %H 4.50, %N 4.32, %S 10.71.

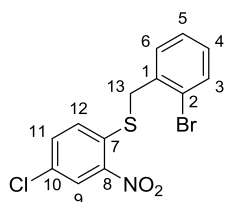
2-Bromobencil 2-cloro-4-nitrofenil sulfuro (56)



Reactivos: 2-bromobencil mercaptano (0.5 mmol, 100.8 mg), 3-cloro-4-fluoronitrobenceno (0.5 mmol, 87.1 mg), acetato de sodio (0.7 mmol, 72.2 mg). Agitación bajo irradiación microondas (85 °C, 1 h 30 min). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:9). Rendimiento: sólido amarillo (57.0 mg, 32%). **P.f.** 107-108 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.30 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H-9), 8.18 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1 H,

H-11), 7.73 (d, $J = 8.8$ Hz, 1 H, H-12), 7.68 (dd, $J = 7.9, 1.3$ Hz, 1 H, H-3), 7.61 (dd, $J = 7.6, 1.7$ Hz, 1 H, H-6), 7.39 (td, $J = 7.6, 1.3$ Hz, 1 H, H-5), 7.28 (td, $J = 7.9, 1.7$ Hz, 1 H, H-4), 4.52 (s, 2 H, H-13). **^{13}C RMN** (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 146.3 (C-7), 145.1 (C-10), 134.6 (C-1), 133.5 (C-3), 131.9 (C-6), 130.5 (C-12), 130.2 (C-8), 128.6 (C-4), 126.8 (C-5), 124.6 (C-2), 124.4 (C-9), 123.0 (C-11), 36.6 (C-13). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (EI) (m/z): 358 [M], 360 [M + 2]. **Análisis elemental** ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{BrClNO}_2\text{S}$) Calculado: %C 43.54, %H 2.53, %N 3.91, %S 8.94. Hallado: %C 43.27, %H 2.28, %N 3.86, %S 8.75.

2-Bromobencil 4-cloro-2-nitrofenil sulfuro (57)

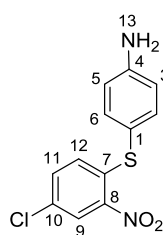


Reactivos: 2-bromobencil mercaptano (0.5 mmol, 100.8 mg), 2,5-dicloronitrobenceno (0.5 mmol, 95.2 mg), acetato de sodio (0.7 mmol, 72.2 mg). Agitación bajo irradiación microondas (85 °C, 1 h 30 min). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:10).

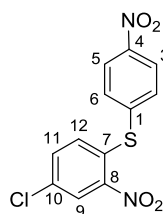
Rendimiento: sólido amarillo (80.0 mg, 45%). **P.f.** 157-158 °C. **^1H RMN** (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.27 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, H-9), 7.83 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1 H, H-11), 7.76 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, H-12), 7.67 (dd, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 1 H, H-3), 7.56 (dd, $J = 7.7, 1.7$ Hz, 1 H, H-6), 7.38 (td, $J = 7.7, 1.3$ Hz, 1 H, H-5), 7.27 (td, $J = 7.7, 1.7$ Hz, 1 H, H-4), 4.44 (s, 2 H, H-13). **^{13}C RMN** (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 146.0 (C-8), 134.9 (C-1), 134.4 (C-7), 134.0 (C-3), 133.0 (C-11), 131.7 (C-12), 130.0 (C-6), 129.8 (C-10), 129.6 (C-4), 128.2 (C-5), 125.4 (C-9), 124.2 (C-2), 37.2 (C-13). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (EI) (m/z): 358 [M], 360 [M + 2]. **Análisis elemental** ($\text{C}_{13}\text{H}_9\text{BrClNO}_2\text{S}$) Calculado: %C 43.54, %H 2.53, %N 3.91, %S 8.94. Hallado: %C 42.96, %H 2.23, %N 3.71, %S 8.58.

Método C

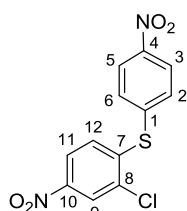
Sobre una disolución del ariltiol (1 equiv) y del haluro de arilo (1 equiv) correspondientes en acetonitrilo, se añade el carbonato de cesio (1.5 equiv, 3 equiv si el haluro de arilo está en forma hidrocioruro), agitándose la mezcla de reacción bajo irradiación microondas a 130 °C durante el tiempo indicado en cada caso. A continuación, se evapora el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se lava con una disolución de NaCl saturado. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico anhidro, y se purifica por cromatografía en columna flash o automática usando el equipo IsoleraOne, empleando las mezclas de eluyentes indicadas en cada caso, obteniéndose así el producto deseado.

4-(4-Cloro-2-nitrofeniltio)anilina (48)

Reactivos: 4-aminotiofenol (1.2 mmol, 150.0 mg), 2,5-dicloronitrobenzoceno (1.2 mmol, 230.1 mg), carbonato de cesio (1.8 mmol, 585.5 mg). Agitación bajo irradiación microondas (130 °C, 8 min). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:4). Rendimiento: sólido amarillo (241.5 mg, 58%). **P.f.** 130-131 °C (lit.¹⁶⁶ 127-129 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.24 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H-9), 7.65 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1 H, H-11), 7.20 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-2, H-6), 6.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H-12), 6.67 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-3, H-5), 5.74 (s, 2 H, H-13). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 151.6 (C-4), 144.2 (C-8), 139.9 (C-7), 137.2 (C-2, C-6), 134.0 (C-11), 129.1 (C-10), 129.0 (C-12), 125.1 (C-9), 115.2 (C-3, C-5), 111.7 (C-1). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 281 [M + 1], 283 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₂H₉ClN₂O₂S) Calculado: %C 51.34, %H 3.23, %N 9.98, %S 11.42. Hallado: %C 51.18, %H 3.11, %N 9.88, %S 11.72.

4-Cloro-2-nitrofenil 4-nitrofenil sulfuro (58)

Reactivos: 4-nitrotiofenol (1.0 mmol, 150.0 mg), 2,5-dicloronitrobenzoceno (1.0 mmol, 185.6 mg), carbonato de cesio (1.5 mmol, 472.6 mg). Agitación bajo irradiación microondas (130 °C, 8 min). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:9). Rendimiento: sólido amarillo (147.6 mg, 49%). **P.f.** 134-135 °C (lit.¹⁶⁷ 135-137 °C).

2-Cloro-4-nitrofenil 4-nitrofenil sulfuro (59)

Reactivos: 4-nitrotiofenol (1.0 mmol, 150.0 mg), 3-cloro-4-fluoronitrobenzoceno (1.0 mmol, 169.7 mg), carbonato de cesio (1.5 mmol, 472.6 mg). Agitación bajo irradiación microondas (130 °C, 8 min). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:9). Rendimiento: sólido amarillo (234.0 mg, 78%). **P.f.** 146-147 °C (lit.¹⁶⁸ 144 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.44 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H-9), 8.29 (d, *J* = 9.0 Hz, 2 H, H-3, H-5), 8.13 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1 H, H-11), 7.73 (d, *J* = 9.0 Hz, 2 H, H-2, H-6), 7.36 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H-12). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 147.5 (C-10), 146.8 (C-4), 142.2 (C-7), 139.4 (C-1), 133.1 (C-2, C-6), 132.9 (C-8), 131.2 (C-12), 125.0 (C-3, C-5), 124.8 (C-9), 123.1 (C-11). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (EI) (*m/z*): 309 [M], 311 [M + 2].

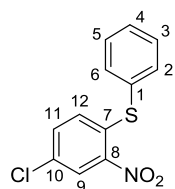
¹⁶⁶ Moore, M. L.; Johnson, T. B. "The molecular rearrangement of sulfenilides III" *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, 58, 1091-1094.

¹⁶⁷ de la Cruz, A.; Elguero, J.; Goya, P.; Martinez, A. "Synthesis and antimicrobial evaluation of new derivatives of diphenylsulfone" *Boll. Chim. Farm.* **1994**, 133, 72-75.

¹⁶⁸ Berg, S. S. "Nuclear-substituted derivatives of 4-4'-diaminodiphenyl sulphone" *J. Chem. Soc.* **1949**, 1991-1993.

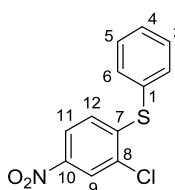
Análisis elemental ($C_{12}H_7ClN_2O_4S$) Calculado: %C 46.39, %H 2.27, %N 9.02, %S 10.32. Hallado: %C 46.15, %H 2.33, %N 9.00, %S 10.18.

4-Cloro-2-nitrofenil fenil sulfuro (60)



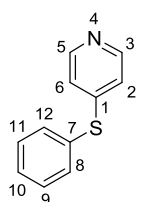
Reactivos: tiofenol (1.8 mmol, 200.0 mg), 2,5-dicloronitrobenzoceno (1.8 mmol, 348.5 mg), carbonato de cesio (2.7 mmol, 887.2 mg). Agitación bajo irradiación microondas (130 °C, 8 min). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 5:95). Rendimiento: sólido amarillo (319.1 mg, 66%). **P.f.** 83-84 °C (lit.¹⁶⁹ 83-84 °C). **¹H RMN** (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.27 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, H-9), 7.64 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1 H, H-11), 7.62-7.57 (m, 2 H, H-ar), 7.57-7.51 (m, 3 H, H-ar), 6.82 (d, J = 8.8 Hz, 1 H, H-12). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO- d_6): δ 145.6 (C-8), 136.8 (C-7), 135.7 (C-11), 134.5 (2 C-ar), 130.9 (C-12), 130.8 (2 C-ar), 130.5 (C-10), 130.2 (C-ar), 130.1 (C-1), 125.6 (C-9). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (EI) (m/z): 265 [M], 267 [M + 2]. **Análisis elemental** ($C_{12}H_8ClNO_2S$) Calculado: %C 54.24, %H 3.03, %N 5.27, %S 12.07. Hallado: %C 54.46, %H 2.98, %N 5.09, %S 12.33.

2-Cloro-4-nitrofenil fenil sulfuro (61)



Reactivos: tiofenol (1.4 mmol, 150.0 mg), 3-cloro-4-fluoronitrobenzoceno (1.4 mmol, 238.7 mg), carbonato de cesio (2.0 mmol, 665.4 mg). Agitación bajo irradiación microondas (130 °C, 8 min). Rendimiento: sólido gris pálido (163.0 mg, 50%). **P.f.** 117-118 °C (lit.¹⁷⁰ 117-118.5 °C).

4-(Feniltio)piridina (84)

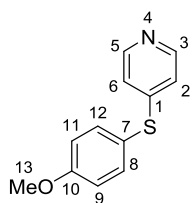


Reactivos: tiofenol (1.8 mmol, 200.0 mg), hidrocloreuro de 4-bromopiridina (1.8 mmol, 353.0 mg), carbonato de cesio (5.4 mmol, 1.76 g). Agitación bajo irradiación microondas (130 °C, 35 min). Purificación: acetato de etilo/hexano (1:2). Rendimiento: aceite amarillo pálido (209.8 mg, 63%). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO- d_6): δ 8.35 (d, J = 6.2 Hz, 2 H, H-3, H-5), 7.68-7.41 (m, 5 H, H-ar), 7.00 (d, J = 6.2 Hz, 2 H, H-2, H-6). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO- d_6): δ 149.6 (C-3, C-5), 149.0 (C-1), 134.9 (2 C-ar), 130.3 (2 C-ar), 129.9 (C-10), 128.6 (C-7), 120.5 (C-2, C-6). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (m/z): 188 [M + 1]. **Análisis elemental** ($C_{11}H_9NS$) Calculado: %C 70.55, %H 4.84, %N 7.48, %S 17.12. Hallado: %C 70.71, %H 4.80, %N 7.24, %S 17.33.

¹⁶⁹ Bunnett, J. F.; Davis, G. T. Kinetics of reactions of 2,4-dinitrochlorobenzene with some familiar nucleophilic reagents. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 3011-3015.

¹⁷⁰ Jones, T. R.; Webber, S. E.; Varney, M. D.; Reddy, M. R.; Lewis, K. K.; Kathardekar, V.; Mazdiyasni, H.; Deal, J.; Nguyen, D.; Welsh, K. M.; Webber, S.; Johnston, A.; Matthews, D. A.; Smith, W. W.; Janson, C. A.; Bacquet, R. J.; Howland, E. F.; Booth, C. L. J.; Herrmann, S. M.; Ward, R. W.; White, J.; Bartlett, C. A.; Morse, C. A. "Structure-based design of substituted diphenyl sulfones and sulfoxides as lipophilic inhibitors of thymidylate synthase" *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 677-683.

4-(4-Metoxifeniltio)piridina (85)

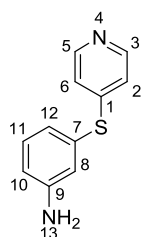


Reactivos: 4-metoxitiofenol (1.4 mmol, 200.0 mg), hidrocloreuro de 4-bromopiridina (1.4 mmol, 225.5 mg), carbonato de cesio (4.2 mmol, 1.37 g). Disolvente: acetonitrilo. Agitación bajo irradiación microondas (130 °C, 35 min). Purificación: columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:9).

Rendimiento: sólido amarillo pálido (160.4 mg, 53%). **P.f.** 96-97 °C. **¹H**

RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.32 (d, *J* = 6.4 Hz, 2 H, H-3, H-5), 7.52 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-8, H-12), 7.09 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-9, H-11), 6.92 (d, *J* = 6.4 Hz, 2 H, H-2, H-6), 3.82 (s, 3 H, H-13). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 166.4 (C-10), 156.0 (C-1), 155.1 (C-3, C-5), 142.9 (C-8, C-12), 125.4 (C-2, C-6), 123.9 (C-7), 121.5 (C-9, C-11), 61.1 (C-13). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 218 [M + 1]. **Análisis elemental** (C₁₂H₁₁NOS) Calculado: %C 66.33, %H 5.10, %N 6.45, %S 14.75. Hallado: %C 66.08, %H 5.24, %N 6.36, %S 14.58.

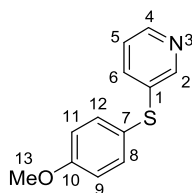
4-(3-Aminofeniltio)piridina (86)



Reactivos: 3-aminotiofenol (1.6 mmol, 200.0 mg), hidrocloreuro de 4-bromopiridina (1.6 mmol, 310.8 mg), carbonato de cesio (4.8 mmol, 1.56 g). Agitación bajo irradiación microondas (130 °C, 35 min). Purificación: columna flash (metanol/diclorometano, 1:10). Rendimiento: sólido amarillo (100.3 mg, 33%). **P.f.** 89-90 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.34 (d, *J* = 6.3 Hz, 2

H, H-3, H-5), 7.14 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H, H-11), 7.02 (d, *J* = 6.3 Hz, 2 H, H-2, H-6), 6.74 (t, *J* = 2.0 Hz, 1 H, H-8), 6.69 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1 H, H-10 o H-12), 6.66 (dd, *J* = 7.3, 1.5 Hz, 1 H, H-10 o H-12), 2.78 (s, 2 H, H-13). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 150.3 (C-9), 149.8 (C-1), 149.3 (C-3, C-5), 130.5 (C-11), 128.3 (C-7), 121.4 (C-10 o C-12), 120.4 (C-2, C-6), 119.2 (C-8), 115.3 (C-10 o C-12). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 203 [M + 1]. **Análisis elemental** (C₁₁H₁₀N₂S) Calculado: %C 65.32, %H 4.98, %N 13.85, %S 15.85. Hallado: %C 65.27, %H 4.78, %N 14.02, %S 15.58.

3-(4-Metoxifeniltio)piridina (87)



Reactivos: 4-metoxitiofenol (1.4 mmol, 200.0 mg), 3-bromopiridina (1.4 mmol, 225.5 mg), carbonato de cesio (2.1 mmol, 697.2 mg). Agitación bajo irradiación microondas (130 °C, 35 min). Purificación: columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:2). Rendimiento: aceite amarillo pálido (180.5

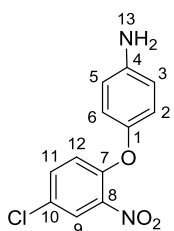
mg, 58%). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.35 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H-2), 8.29 (dd, *J* = 4.8, 1.5 Hz, 1 H, H-4), 7.37-7.33 (m, 3 H, H-6, H-9, H-11), 7.07 (dd, *J* = 8.0, 4.7 Hz, 1 H, H-5), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, H-8, H-12), 3.76 (s, 3 H, H-13). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 160.7 (C-10), 149.3 (C-2), 147.2 (C-4), 136.4 (C-1), 136.1 (C-8, C-12), 135.8 (C-6),

124.1 (C-5), 123.0 (C-7), 115.7 (C-9, C-11), 55.8 (C-13). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (m/z): 218 [M + 1]. **Análisis elemental** (C₁₂H₁₁NOS) Calculado: %C 66.33, %H 5.10, %N 6.45, %S 14.75. Hallado: %C 66.29, %H 5.08, %N 6.31, %S 14.66.

Método D

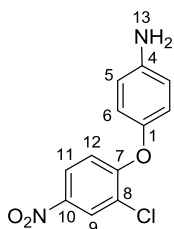
Sobre una disolución del fenol (1.5 equiv) y del haluro de arilo (1 equiv) correspondientes en *N,N*-dimetilformamida, se añade el carbonato de potasio (2 equiv), agitándose la mezcla de reacción bajo irradiación microondas durante 10 minutos a 150 °C. A continuación, se evapora el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se lava con una disolución de NaCl saturado. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico anhidro, y se purifica por cromatografía en columna flash o automática usando el equipo IsoleraOne, empleando las mezclas de eluyentes indicadas en cada caso, obteniéndose así el producto deseado.

4-(4-Cloro-2-nitrofenoxi)anilina (62)



Reactivos: 4-aminofenol (1.6 mmol, 170.5 mg), 2,5-dicloronitrobenzoceno (1.0 mmol, 200.0 mg), carbonato de potasio (2.1 mmol, 287.5 mg). Purificación: columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:6). Rendimiento: sólido amarillo (177.0 mg, 40%). **P.f.** 91-92 °C. **¹H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.11 (d, *J* = 2.7 Hz, 1 H, H-9), 7.64 (dd, *J* = 9.1, 2.7 Hz, 1 H, H-11), 6.90 (d, *J* = 9.1 Hz, 1 H, H-12), 6.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, H-2, H-6), 6.59 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, H-3, H-5), 5.15 (s, 2 H, H-13). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 150.5 (C-7), 146.6 (C-4), 143.9 (C-1), 140.1 (C-8), 134.2 (C-11), 125.3 (C-10), 124.8 (C-9), 120.9 (C-2), 119.5 (C-12), 114.8 (C-3). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (m/z): 265 [M + 1], 267 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₂H₉ClN₂O₃) Calculado: %C 54.46, %H 3.43, %N 10.58. Hallado: %C 54.35, %H 3.21, %N 10.44.

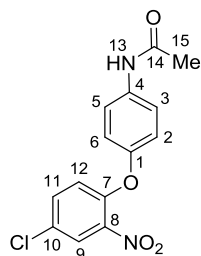
4-(2-Cloro-4-nitrofenoxi)anilina (63)



Reactivos: 4-aminofenol (1.7 mmol, 186.5 mg), 3-cloro-4-fluoronitrobenzoceno (1.1 mmol, 200.0 mg), carbonato de potasio (2.3 mmol, 314.6 mg). Purificación: columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:4). Rendimiento: sólido amarillo (163.3 mg, 54%). **P.f.** 92-93 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.38 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, H-9), 8.13 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1 H, H-11), 6.87 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H-2, H-6), 6.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H-12), 6.63 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H-3, H-5), 5.20 (s, 2 H, H-13). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 160.3 (C-7), 147.4 (C-4), 143.7 (C-1), 141.8 (C-10), 126.3 (C-9), 124.9 (C-11), 122.3 (C-8), 121.6 (C-2), 115.9 (C-12), 115.3 (C-5). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (m/z): 265 [M + 1], 267 [M

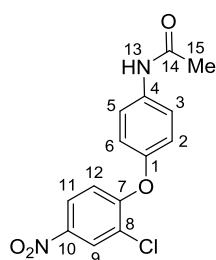
+ 3]. **Análisis elemental** ($C_{12}H_9ClN_2O_3$) Calculado: %C 54.46, %H 3.43, %N 10.58. Hallado: %C 54.71, %H 3.44, %N 10.62.

***N*-[4-(4-Cloro-2-nitrofenoxi)fenil]acetamida (64)**



Reactivos: *N*-(4'-hidroxifenil)acetamida (1.2 mmol, 177.2 mg), 2,5-dicloronitrobenzo (0.8 mmol, 150.0 mg), carbonato de potasio (1.6 mmol, 215.6 mg). Aislamiento: precipitación con NaOH al 40% y filtración del sólido formado. Rendimiento: sólido blanco (145.9 mg, 72%). **P.f.** 156-157 °C. **1H RMN** (300 MHz, DMSO- d_6): δ 10.04 (s, 1 H, H-13), 8.18 (d, J = 2.7 Hz, 1 H, H-9), 7.70 (dd, J = 9.1, 2.7 Hz, 1 H, H-11), 7.63 (d, J = 9.0 Hz, 1 H, H-3, H-5), 7.07 (d, J = 9.0 Hz, 1 H, H-2, H-6), 7.06 (d, J = 9.1 Hz, 1 H, H-12), 2.03 (s, 3 H, H-15). **^{13}C RMN** (75 MHz, DMSO- d_6): δ 168.2 (C-14), 150.0 (C-1), 148.9 (C-7), 140.9 (C-8), 136.4 (C-4), 134.5 (C-11), 126.7 (C-10), 125.1 (C-9), 121.3 (C-12), 120.7 (C-3, C-5), 119.6 (C-2, C-6), 23.9 (C-15). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (m/z): 307 [M + 1], 309 [M + 3]. **Análisis elemental** ($C_{14}H_{11}ClN_2O_4$) Calculado: %C 54.83, %H 3.62, %N 9.13. Hallado: %C 54.77, %H 3.60, %N 9.08.

***N*-[4-(2-Cloro-4-nitrofenoxi)fenil]acetamida (65)**



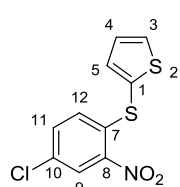
Reactivos: *N*-(4'-hidroxifenil)acetamida (1.3 mmol, 194.2 mg), 3-cloro-4-fluoronitrobenzo (0.9 mmol, 150.0 mg), carbonato de potasio (1.7 mmol, 235.7 mg). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 1:3). Rendimiento: sólido amarillo (202.4 mg, 78%). **P.f.** 158-159 °C. **1H RMN** (300 MHz, DMSO- d_6): δ 10.08 (s, 1 H, H-13), 8.44 (d, J = 2.7 Hz, 1 H, H-9), 8.15 (dd, J = 9.2, 2.7 Hz, 1 H, H-11), 7.68 (d, J = 9.0 Hz, 2 H, H-3, H-5), 7.15 (d, J = 9.0 Hz, 2 H, H-2, H-6), 6.95 (d, J = 9.2 Hz, 1 H, H-12), 2.05 (s, 3 H, H-15). **^{13}C RMN** (75 MHz, DMSO- d_6): δ 168.2 (C-14), 158.7 (C-7), 148.9 (C-1), 142.1 (C-10), 137.1 (C-4), 126.0 (C-9), 124.5 (C-11), 120.7 (C-2, C-6), 120.6 (C-3, C-5), 116.8 (C-12), 23.9 (C-15). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (m/z): 307 [M + 1], 309 [M + 3]. **Análisis elemental** ($C_{14}H_{11}ClN_2O_4$) Calculado: %C 54.83, %H 3.62, %N 9.13. Hallado: %C 53.18, %H 3.86, %N 8.78.

Método E

Sobre una disolución del 2-tieniltiol (1 equiv) y del haluro de arilo correspondiente (1 equiv) en tetrahidrofurano, se añade el carbonato de potasio (2 equiv), agitándose la mezcla de reacción bajo irradiación microondas durante 30 minutos a 40 °C. A continuación, se evapora el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se lava

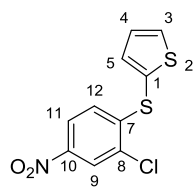
con una disolución de NaCl saturado. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico anhidro, y se purifica por cromatografía en columna flash o automática usando el equipo IsoleraOne, empleando las mezclas de eluyentes indicadas en cada caso, obteniéndose así el producto deseado.

4-Cloro-2-nitrofenil 2-tienil sulfuro (66)



Reactivos: 2-tiofenotiol (1.1 mmol, 125.0 mg), 2,5-dicloronitrobenzoceno (1.1 mmol, 206.8 mg), carbonato de potasio (2.2 mmol, 306.9 mg). Purificación: columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:40). Rendimiento: sólido amarillo (269.0 mg, 92%). **P.f.** 124-125 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.32 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H-9), 8.04 (dd, *J* = 5.3, 1.3 Hz, 1 H, H-3), 7.76 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1 H, H-11), 7.59 (dd, *J* = 3.5, 1.3 Hz, 1 H, H-5), 7.33 (dd, *J* = 5.3, 3.5 Hz, 1 H, H-4), 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H-12). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 144.9 (C-8), 139.7 (C-5), 137.6 (C-7), 135.6 (C-3), 134.9 (C-11), 130.8 (C-10), 129.8 (C-4), 129.1 (C-12), 126.8 (C-1), 125.7 (C-9). **Pureza por HPLC** >98%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 271 [M], 273 [M + 2]. **Análisis elemental** (C₁₀H₆ClN₂O₂S₂) Calculado: %C 44.20, %H 2.23, %N 5.15, %S 23.60. Hallado: %C 43.99, %H 2.00, %N 4.98, %S 23.75.

2-Cloro-4-nitrofenil 2-tienil sulfuro (67)



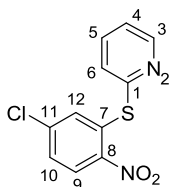
Reactivos: 2-tieniltiol (0.6 mmol, 75.0 mg), 3-cloro-4-fluoronitrobenzoceno (0.6 mmol, 113.5 mg), carbonato de potasio (1.2 mmol, 169.1 mg). Purificación: columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:40). Rendimiento: sólido amarillo (139.8 mg, 80%). **P.f.** 79-80 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.34 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H-9), 8.13 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1 H, H-11), 8.07 (dd, *J* = 5.4, 1.3 Hz, 1 H, H-3), 7.61 (dd, *J* = 3.6, 1.3 Hz, 1 H, H-5), 7.34 (dd, *J* = 5.4, 3.6 Hz, 1 H, H-4), 6.86 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, H-12). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 147.4 (C-7), 145.8 (C-10), 139.8 (C-5), 135.9 (C-3), 129.9 (C-4), 129.0 (C-8), 126.4 (C-12), 124.7 (C-9), 124.4 (C-1), 123.5 (C-11). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 271 [M], 273 [M + 2]. **Análisis elemental** (C₁₀H₆ClN₂O₂S₂) Calculado: %C 44.20, %H 2.23, %N 5.15, %S 23.60. Hallado: %C 43.95, %H 2.12, %N 4.98, %S 23.78.

Método F

Sobre una disolución del piridiltiol (1 equiv) y del haluro de arilo (1 equiv) correspondientes en *N,N*-dimetilformamida se añade el carbonato de potasio (1 equiv), agitándose la mezcla de reacción bajo irradiación microondas durante 10 minutos a 150 °C. A continuación, se evapora el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se

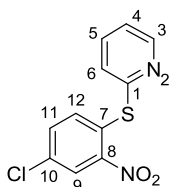
lava con una disolución de NaCl saturado. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico anhidro, y se purifica por cromatografía en columna flash o automática usando el equipo IsoleraOne, empleando las mezclas de eluyentes indicadas en cada caso, obteniéndose así el producto deseado.

2-[(5-Cloro-2-nitrofenil)tio]-piridina (68)



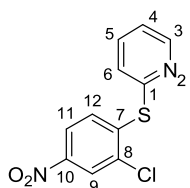
Reactivos: 2-mercaptopiridina (0.9 mmol, 100.0 mg), 2,4-dicloronitrobenceno (0.9 mmol, 172.6 mg), carbonato de potasio (0.9 mmol, 124.1 mg). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 3:7). Rendimiento: sólido amarillo (127.0 mg, 53%). **P.f.** 95-96 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.59 (dd, *J* = 4.8, 1.9 Hz, 1 H, H-3), 8.23 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H-9), 7.89 (td, *J* = 7.7, 1.9 Hz, 1 H, H-5), 7.64 (dd, *J* = 7.7, 1.1 Hz, 1 H, H-6), 7.63 (dd, *J* = 8.8, 2.3 Hz, 1 H, H-10), 7.43 (ddd, *J* = 7.7, 4.8, 1.1 Hz, 1 H, H-4), 7.38 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, H-12). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 154.3 (C-1), 151.2 (C-3), 146.9 (C-8), 138.9 (C-5), 138.8 (C-7), 133.8 (C-11), 131.6 (C-12), 128.5 (C-6), 127.7 (C-9), 127.4 (C-10), 123.9 (C-4). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 267 [M + 1], 269 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₁H₇ClN₂O₂S) Calculado: %C 49.54, %H 2.65, %N 10.50, %S 12.02. Hallado: %C 49.35, %H 2.56, %N 10.48, %S 11.83.

2-[(4-Cloro-2-nitrofenil)tio]-piridina (69)



Reactivos: 2-mercaptopiridina (1.3 mmol, 150.0 mg), 2,5-dicloronitrobenceno (1.3 mmol, 259.1 mg), carbonato de potasio (1.3 mmol, 186.2 mg). Rendimiento: sólido amarillo (332.4 mg, 92%). **P.f.** 81-82 °C (lit.¹⁶⁴ 82 °C). **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.54-8.46 (m, 1 H, H-3), 8.28 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, H-9), 7.83 (td, *J* = 7.7, 1.9 Hz, 1 H, H-5), 7.75 (dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz, 1 H, H-11), 7.52 (dd, *J* = 7.9, 1.9 Hz, 1 H, H-6), 7.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, H-12), 7.35 (ddd, *J* = 7.5, 4.8, 1.9 Hz, 1 H, H-4). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 155.1 (C-1), 150.9 (C-3), 149.8 (C-8), 138.6 (C-5), 135.3 (C-11), 133.9 (C-12), 133.1 (C-10), 128.9 (C-7), 126.3 (C-6), 125.4 (C-9), 123.4 (C-4). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 267 [M + 1], 269 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₁H₇ClN₂O₂S) Calculado: %C 49.54, %H 2.65, %N 10.50, %S 12.02. Hallado: %C 49.61, %H 2.89, %N 10.40, %S 11.88.

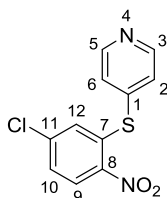
2-[(2-Cloro-4-nitrofenil)tio]-piridina (70)



Reactivos: 2-mercaptopiridina (1.3 mmol, 150.0 mg), 3-cloro-4-fluoronitrobenzeno (1.3 mmol, 236.9 mg), carbonato de potasio (1.3 mmol, 186.2 mg). Rendimiento: sólido marrón (275.7 mg, 76%). **P.f.** 104-105 °C.

¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.54 (ddd, *J* = 4.8, 1.9, 0.9 Hz, 1 H, H-3), 8.40 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, H-9), 8.14 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1 H, H-11), 7.85 (td, *J* = 7.7, 1.9 Hz, 1 H, H-5), 7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, H-12), 7.52 (td, *J* = 7.7, 1.0 Hz, 1 H, H-6), 7.38 (ddd, *J* = 7.7, 4.8, 1.0 Hz, 1 H, H-4). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 153.8 (C-1), 150.7 (C-3), 146.9 (C-10), 141.2 (C-7), 138.4 (C-5), 134.2 (C-8), 132.9 (C-12), 125.9 (C-6), 124.6 (C-9), 123.0 (C-4), 122.6 (C-11). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 267 [M + 1], 269 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₁H₇ClN₂O₂S) Calculado: %C 49.54, %H 2.65, %N 10.50, %S 12.02. Hallado: %C 49.37, %H 2.54, %N 10.39, %S 11.97.

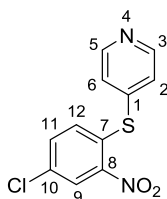
4-[(5-Cloro-2-nitrofenil)tio]-piridina (71)



Reactivos: 4-mercaptopiridina (0.9 mmol, 100.0 mg), 2,4-dicloronitrobenzeno (0.9 mmol, 172.6 mg), carbonato de potasio (0.9 mmol, 124.1 mg). Purificación: columna flash (acetato de etilo/hexano, 3:7).

Rendimiento: sólido amarillo (108.0 mg, 45%). **P.f.** 149-150 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.64 (d, *J* = 6.0 Hz, 2 H, H-3, H-5), 8.26 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, H-9), 7.64 (dd, *J* = 8.9, 2.1 Hz, 1 H, H-11), 7.52 (d, *J* = 6.0 Hz, 2 H, H-2, H-6), 7.23 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, H-12). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 150.9 (C-3, C-5), 146.3 (C-8), 142.5 (C-1), 139.2 (C-7), 133.8 (C-11), 130.4 (C-12), 128.3 (C-10), 127.7 (C-9), 126.6 (C-2, C-6). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 267 [M + 1], 269 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₁H₇ClN₂O₂S) Calculado: %C 49.54, %H 2.65, %N 10.50, %S 12.02. Hallado: %C 49.25, %H 2.55, %N 10.31, %S 11.97.

4-[(4-Cloro-2-nitrofenil)tio]-piridina (72)

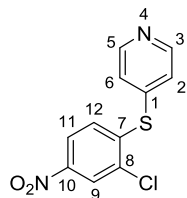


Reactivos: 4-mercaptopiridina (0.9 mmol, 100.0 mg), 2,5-dicloronitrobenzeno (0.9 mmol, 172.6 mg), carbonato de potasio (0.9 mmol, 124.1 mg). Purificación: columna flash (acetato de etilo/hexano, 3:7).

Rendimiento: sólido amarillo (213.0 mg, 88%). **P.f.** 106-107 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.58 (d, *J* = 6.1 Hz, 2 H, H-3, H-5), 8.33 (d, *J* = 1.9 Hz, 1 H, H-9), 7.76 (dd, *J* = 8.7, 1.9 Hz, 1 H, H-11), 7.43 (d, *J* = 6.1 Hz, 2 H, H-2, H-6), 7.37 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, H-12). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 150.5 (C-3, C-5), 148.9 (C-8), 143.3 (C-1), 134.1 (C-7), 133.9 (C-11), 132.8 (C-10), 128.9 (C-12), 125.6 (C-2, C-6), 125.2 (C-9). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 267 [M + 1], 269 [M + 3]. **Análisis**

elemental ($C_{11}H_7ClN_2O_2S$) Calculado: %C 49.54, %H 2.65, %N 10.50, %S 12.02. Hallado: %C 49.36, %H 2.47, %N 10.28, %S 11.95.

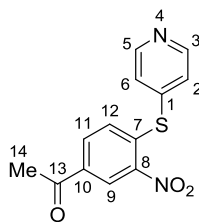
4-[(2-Cloro-4-nitrofenil)tio]piridina (73)



Reactivos: 4-mercaptopiridina (0.9 mmol, 100.0 mg), 3-cloro-4-fluoronitrobenzeno (0.9 mmol, 157.9 mg), carbonato de potasio (0.9 mmol, 124.1 mg). Purificación: columna automática (acetato de etilo/hexano, 3:7). Rendimiento: sólido amarillo pálido (124.0 mg, 52%). **P.f.** 133-134 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO- d_6): δ 8.58 (d, J = 6.2 Hz, 2 H, H-3, H-5),

8.45 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, H-9), 8.17 (dd, J = 8.7, 2.4 Hz, 1 H, H-11), 7.53 (d, J = 8.7 Hz, 1 H, H-12), 7.39 (d, J = 6.2 Hz, 2 H, H-2, H-6). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO- d_6): δ 150.6 (C-3, C-5), 147.2 (C-10), 142.3 (C-1), 140.3 (C-7), 134.2 (C-8), 132.6 (C-12), 125.0 (C-2, C-6), 124.9 (C-9), 123.1 (C-11). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (m/z): 267 [$M + 1$], 269 [$M + 3$]. **Análisis elemental** ($C_{11}H_7ClN_2O_2S$) Calculado: %C 49.54, %H 2.65, %N 10.50, %S 12.02. Hallado: %C 49.25, %H 2.56, %N 10.28, %S 11.79.

4-(4-Acetil-2-nitrofeniltio)piridina (74)



Reactivos: 4-mercaptopiridina (1.3 mmol, 150.0 mg), 4-bromo-3-nitroacetofenona (1.3 mmol, 329.3 mg), carbonato de potasio (1.3 mmol, 186.2 mg). Purificación: columna flash (metanol/diclorometano, 1:20).

Rendimiento: sólido naranja (146.9 mg, 40%). **P.f.** 134-135 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO- d_6): δ 8.68 (d, J = 6.0 Hz, 2 H, H-3, H-5), 8.65 (d, J =

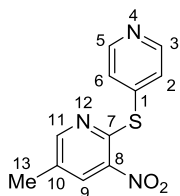
2.0 Hz, 1 H, H-9), 8.12 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1 H, H-11), 7.58 (d, J = 6.0 Hz, 2 H, H-2, H-6), 7.30 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, H-12), 2.72 (s, 3 H, H-14). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO- d_6): δ 195.7 (C-13), 151.0 (C-3, C-5), 146.5 (C-8), 141.5 (C-1), 138.1 (C-7), 135.2 (C-10), 133.0 (C-11), 130.7 (C-12), 127.6 (C-2, C-6), 125.2 (C-9), 30.8 (C-14). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (m/z): 275 [$M + 1$]. **Análisis elemental** ($C_{13}H_{10}N_2O_3S$) Calculado: %C 56.93, %H 3.67, %N 10.21, %S 11.69. Hallado: %C 57.02, %H 3.74, %N 10.30, %S 11.82.

Método G

Una mezcla del ariltiol (1 equiv) y de la 2-haloarilpiridina (1 equiv) correspondientes junto con agua se agita bajo irradiación microondas a 100 °C durante 30 minutos. A continuación, se evapora el disolvente a presión reducida, se añaden 100 mL de acetato de etilo y el crudo de reacción se lava con una disolución de NaCl saturado. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico anhidro, y se purifica por cromatografía en

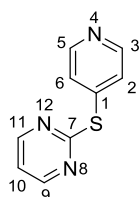
columna flash o automática usando el equipo IsoleraOne, empleando las mezclas de eluyentes indicadas en cada caso, obteniéndose así el producto deseado.

5-Metil-3-nitro-2-(4-piridiniltio)piridina (79)



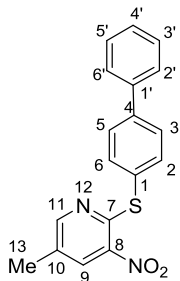
Reactivos: 4-mercaptopiridina (1.4 mmol, 150.0 mg), 2-cloro-5-metil-3-nitropiridina (1.4 mmol, 234.9 mg). Purificación: columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:4). Rendimiento: sólido naranja (255.2 mg, 76%). **P.f.** 128-129 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.61 (d, *J* = 6.1 Hz, 2 H, H-3, H-5), 8.57-8.50 (m, 2 H, H-9, H-11), 7.54 (d, *J* = 6.1 Hz, 2 H, H-2, H-6), 2.36 (s, 3 H, H-13). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 154.4 (C-9 o C-11), 150.2 (C-8), 150.0 (C-3, C-5), 141.8 (C-7), 140.5 (C-1), 134.2 (C-9 o C-11), 132.0 (C-10), 128.8 (C-2, C-6), 16.7 (C-13). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 248 [M + 1]. **Análisis elemental** (C₁₁H₉N₃O₂S) Calculado: %C 53.43, %H 3.67, %N 16.99, %S 12.97. Hallado: %C 53.27, %H 3.80, %N 17.00, %S 13.04.

2-(4-Piridiniltio)pirimidina (80)



Reactivos: 4-mercaptopiridina (0.9 mmol, 100.0 mg), 2-cloropirimidina (0.9 mmol, 103.9 mg). Purificación: columna flash (metanol/diclorometano, 1:20). Rendimiento: sólido naranja (50.2 mg, 30%). **P.f.** 82-83 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.67 (d, *J* = 4.9 Hz, 2 H, H-9, H-11), 8.61 (d, *J* = 6.1 Hz, 2 H, H-3, H-5), 7.65 (d, *J* = 6.1 Hz, 2 H, H-2, H-6), 7.34 (t, *J* = 4.9 Hz, 1 H, H-10). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.8 (C-7), 158.4 (C-9, C-11), 150.0 (C-3, C-5), 140.2 (C-1), 127.5 (C-2, C-6), 118.8 (C-10). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 190 [M + 1]. **Análisis elemental** (C₉H₇N₃S) Calculado: %C 57.12, %H 3.73, %N 22.21, %S 16.94. Hallado: %C 57.20, %H 3.85, %N 22.43, %S 17.08.

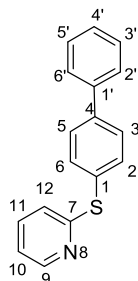
2-[(1,1'-Bifenil)-4-tio]-5-metil-3-nitropiridina (81)



Reactivos: bifenil-4-tiol (0.8 mmol, 150.0 mg), 2-cloro-5-metil-3-nitropiridina (0.8 mmol, 138.9 mg). Purificación: columna automática (diclorometano). Rendimiento: sólido amarillo (89.3 mg, 55%). **P.f.** 133-134 °C. **¹H RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.49 (s, 1H, H-9 o H-11), 8.48 (s, 1H, H-9 o H-11), 7.74 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-3, H-5), 7.72 (dd, *J* = 7.4, 1.2 Hz, 2 H, H-2', H-6'), 7.60 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-2, H-6), 7.49 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, H-3', H-5'), 7.40 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H, H-4'), 2.33 (s, 3 H, H-13). **¹³C RMN** (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 154.9 (C-9 o C-11), 153.2 (C-8), 141.6 (C-7), 141.5 (C-4), 139.6 (C-1'), 136.6 (C-2, C-6), 134.5 (C-9 o C-11), 131.5 (C-10), 129.5 (C-3', C-5'), 128.9 (C-1), 128.4 (C-4'), 128.0 (C-3, C-5), 127.3 (C-2', C-6'), 17.1 (C-13). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 323 [M + 1].

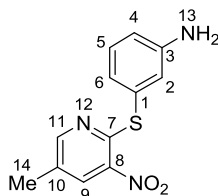
Análisis elemental ($C_{18}H_{14}N_2O_2S$) Calculado: %C 67.06, %H 4.38, %N 8.69, %S 9.94. Hallado: %C 67.15, %H 4.33, %N 8.78, %S 10.02.

2-(1,1'-Bifenil)-4-tiopiridina (82)



Reactivos: bifenil-4-tiol (0.8 mmol, 150.0 mg), 2-bromopiridina (0.8 mmol, 127.2 mg). Purificación: columna flash (acetato de etilo/hexano, 1:10). Rendimiento: sólido amarillo pálido (147.2 mg, 70%). **P.f.** 41-42 °C. **1H RMN** (500 MHz, $DMSO-d_6$): δ 8.40 (ddd, $J = 4.8, 1.7, 0.8$ Hz, 1 H, H-9), 7.77 (d, $J = 8.1$ Hz, 2 H, H-3, H-5), 7.71 (dd, $J = 7.3, 1.8$ Hz, 2 H, H-2', H-6'), 7.69-7.66 (m, 1 H, H-11), 7.64 (d, $J = 8.1$ Hz, 2 H, H-2, H-6), 7.48 (t, $J = 7.8$ Hz, 2 H, H-3', H-5'), 7.39 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H, H-4'), 7.15 (ddd, $J = 7.4, 4.8, 0.8$ Hz, 1 H, H-10), 7.03 (dd, $J = 7.4, 0.8$ Hz, 1 H, H-12). **^{13}C RMN** (125 MHz, $DMSO-d_6$): δ 160.1 (C-7), 150.1 (C-9), 141.3 (C-4), 139.5 (C-1'), 137.9 (C-11), 135.5 (C-2, C-6), 129.8 (C-1), 129.5 (C-3', C-5'), 128.4 (C-3, C-5), 128.3 (C-4'), 127.2 (C-2', C-6'), 121.7 (C-12), 121.1 (C-10). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (m/z): 264 [M + 1]. **Análisis elemental** ($C_{17}H_{13}NS$) Calculado: %C 77.53, %H 4.98, %N 5.32, %S 12.17. Hallado: %C 77.61, %H 5.09, %N 5.11, %S 12.31.

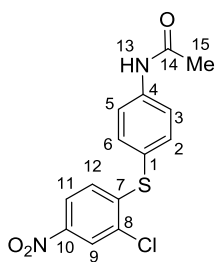
5-Metil-3-nitro-2-(3-aminofeniltio)piridina (83)



Reactivos: 3-aminotiofenol (1.2 mmol, 150.0 mg), 2-cloro-5-metil-3-nitropiridina (1.2 mmol, 206.8 mg). Purificación: columna flash (metanol/diclorometano, 1:30). Rendimiento: sólido amarillo pálido (155.0 mg, 50%). **P.f.** 157-158 °C. **1H RMN** (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 8.31 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, H-9 o H-11), 8.21 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H, H-9 o H-11), 7.15 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H, H-5), 6.86 (dt, $J = 7.6, 1.4$ Hz, 1 H, H-6), 6.81-6.79 (m, 1 H, H-2), 6.68 (ddd, $J = 8.1, 2.3, 1.4$ Hz, 1 H, H-4), 3.66 (s, 2 H, H-13), 2.29 (s, 3 H, H-14). **^{13}C RMN** (75 MHz, $DMSO-d_6$): δ 154.6 (C-3), 152.2 (C-9 o C-11), 147.5 (C-8), 133.9 (C-9 o C-11), 130.8 (C-1), 130.3 (C-5), 130.1 (C-10), 126.2 (C-6), 122.4 (C-2), 116.7 (C-4), 17.7 (C-14). **Pureza por HPLC** >98%. **EM** (ESI+) (m/z): 262 [M + 1]. **Análisis elemental** ($C_{12}H_{11}N_3O_2S$) Calculado: %C 55.16, %H 4.24, %N 16.08, %S 12.27. Hallado: %C 55.31, %H 4.40, %N 16.22, %S 12.40.

1.4. N-acetilación de derivados de sulfuro

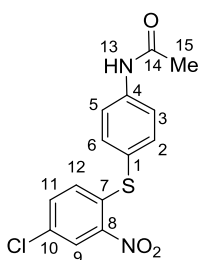
N-[4-(2-Cloro-4-nitrofeniltio)fenil]acetamida (75)



Una mezcla de 100.0 mg de 4-(2-cloro-4-nitrofeniltio)anilina (**38**) (0.4 mmol, 1 equiv), 0.025 mL of cloruro de acetilo (0.4 mmol, 1 equiv) y tetrahidrofurano (1 mL) se agitan bajo irradiación microondas (110 °C, 20 min). Se deja enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo se disuelve en acetato de etilo (100 mL), y se lava con 3 disoluciones acuosas: HCl

0.1M (100 mL), NaHCO₃ saturada (100 mL) y NaCl saturado (100 mL). La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico anhidro, y el producto deseado se obtiene como un sólido amarillo (80.5 mg, 70%). **P.f.** 166-167 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.27 (s, 1 H, H-13), 8.31 (d, *J* = 2.6 Hz, 1 H, H-9), 8.05 (dd, *J* = 8.9, 2.6 Hz, 1 H, H-11), 7.79 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H, H-2, H-6), 7.56 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H, H-3, H-5), 6.75 (d, *J* = 8.9 Hz, 1 H, H-12), 2.08 (s, 3 H, H-14). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 169.2 (C-13), 148.4 (C-7), 145.3 (C-10), 142.0 (C-4), 136.9 (C-2, C-6), 129.1 (C-8), 126.5 (C-12), 124.6 (C-11), 123.2 (C-9), 120.9 (C-3, C-5), 120.7 (C-1), 24.5 (C-14). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 323 [M + 1], 325 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₄H₁₁ClN₂O₃S) Calculado: %C 52.10, %H 3.44, %N 8.68, %S 9.93. Hallado: %C 51.92, %H 3.65, %N 8.69, %S 9.64.

N-[4-(4-Cloro-2-nitrofeniltio)fenil]acetamida (76)



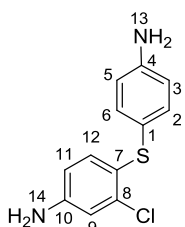
Una mezcla de 100.0 mg de 4-(4-cloro-2-nitrofeniltio)anilina (**48**) (0.4 mmol, 1 equiv), 0.025 mL of cloruro de acetilo (0.4 mmol, 1 equiv) y tetrahidrofurano (1 mL) se agitan bajo irradiación microondas (110 °C, 20 min). Se deja enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo se disuelve en acetato de etilo (100 mL), y se lava con 3 disoluciones acuosas: HCl 0.1M (100 mL),

NaHCO₃ saturada (100 mL) y NaCl saturado (100 mL). La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico anhidro, y se purifica mediante cromatografía en columna flash, usando como eluyentes acetato de etilo/hexano (1:5). Rendimiento: sólido amarillo (80.0 mg, 70%). **P.f.** 197-198 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.24 (s, 1 H, H-13), 8.28 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H-9), 7.75 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, H-2, H-6), 7.66 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1 H, H-11), 7.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, H-3, H-5), 6.80 (d, *J* = 8.8 Hz, 1 H, H-12), 2.08 (s, 3 H, H-14). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 168.8 (C-14), 144.7 (C-8), 141.4 (C-4), 137.6 (C-7), 136.5 (C-2, C-6), 134.1 (C-11), 129.7 (C-10), 129.4 (C-12), 125.2 (C-9), 122.2 (C-1), 120.4 (C-3, C-5), 24.1 (C-15). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 323 [M + 1], 325 [M + 3].

Análisis elemental ($C_{14}H_{11}ClN_2O_3S$) Calculado: %C 52.10, %H 3.44, %N 8.68, %S 9.93. Hallado: %C 51.98, %H 3.31, %N 8.39, %S 9.74.

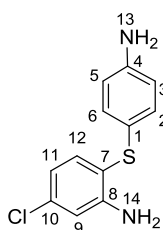
1.5. Reducción de nitroderivados de sulfuro

4-(4-Aminofeniltio)-3-cloroanilina (77)



Una mezcla de 100.0 mg de 4-(4-cloro-2-nitrofeniltio)anilina (**38**) (0.4 mmol, 1 equiv), 442.1 mg de cloruro de estaño (II) dihidrato (2.0 mmol, 5.5 equiv) y 6 mL de etanol se agitan bajo irradiación microondas (110 °C, 5 min). Se deja enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo se disuelve en acetato de etilo (100 mL), y se lava con disoluciones saturadas de $NaHCO_3$ (100 mL) y $NaCl$ (100 mL), simultáneamente. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico anhidro, y se purifica mediante cromatografía en columna flash, usando como eluyentes acetato de etilo/hexano (1:3). Rendimiento: aceite amarillo (102.3 mg, 76%). **1H RMN** (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 7.00 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-2, H-6), 6.82 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, H-12), 6.63 (d, J = 2.2 Hz, 1 H, H-9), 6.52 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-3, H-5), 6.42 (dd, J = 8.4, 2.2 Hz, 1 H, H-11), 5.45 (s, 2 H, NH_2), 5.32 (s, 2 H, NH_2). **^{13}C RMN** (75 MHz, $DMSO-d_6$): δ 149.7 (C-4), 149.2 (C-10), 134.7 (C-8), 134.0 (C-2, C-6), 133.4 (C-12), 120.4 (C-1), 118.5 (C-7), 115.0 (C-3, C-5), 114.5 (C-11), 113.9 (C-9). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (m/z): 251 [$M + 1$], 253 [$M + 3$]. **Análisis elemental** ($C_{12}H_{11}ClN_2S$) Calculado: %C 57.48, %H 4.42, %N 11.17, %S 12.79. Hallado: %C 57.26, %H 4.36, %N 11.30, %S 12.60.

2-(4-Aminofeniltio)-5-cloroanilina (78)



Una mezcla de 100.0 mg de 4-(4-cloro-2-nitrofeniltio)anilina (**48**) (0.4 mmol, 1 equiv), 442.1 mg de cloruro de estaño (II) dihidrato (2.0 mmol, 5.5 equiv) y 6 mL de etanol se agitan bajo irradiación microondas (110 °C, 5 min). Se deja enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo se disuelve en acetato de etilo (100 mL), y se lava con disoluciones saturadas de $NaHCO_3$ (100 mL) y $NaCl$ (100 mL), simultáneamente. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico anhidro, y se purifica mediante cromatografía en columna flash, usando como eluyentes acetato de etilo/hexano (1:3). Rendimiento: aceite azul (70.0 mg, 78%). **1H RMN** (300 MHz, $DMSO-d_6$): δ 7.01 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, H-12), 7.00 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-2, H-6), 6.68 (d, J = 2.3 Hz, 1 H, H-9), 6.48 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-3, H-5), 6.47 (d, J = 8.3, 2.3 Hz, 1 H, H-11), 5.47 (s, 2H, NH_2), 5.26 (s, 2H, NH_2). **^{13}C RMN** (75 MHz, $DMSO-d_6$): δ 149.6 (C-4), 149.1 (C-8), 135.0 (C-12), 133.4 (C-10), 133.3 (C-2, C-6), 117.9 (C-1), 117.7 (C-7), 116.3 (C-11), 115.0 (C-3, C-5),

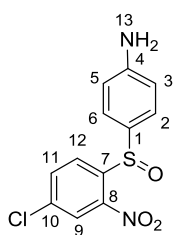
113.7 (C-9). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (m/z): 251 [M + 1], 253 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₂H₁₁ClN₂S) Calculado: %C 57.48, %H 4.42, %N 11.17, %S 12.79. Hallado: %C 57.47, %H 4.52, %N 11.20, %S 12.62.

1.6. Síntesis de derivados de sulfóxido y sulfona

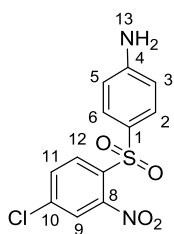
Sobre una disolución del derivado de diarilsulfuro correspondiente (1 equiv) en 15 mL de metanol, se añade una disolución de Oxone® (0.8 equiv) preparada en 15 mL de agua. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, el crudo de reacción se lava con una disolución de NaCl saturado y se purifica por cromatografía en columna flash empleando una mezcla de acetato de etilo/hexano como eluyentes, en las proporciones indicadas en cada caso, obteniéndose así los productos deseados.

4-((4-Cloro-2-nitrofenil)sulfinil)anilina (**88**) y 4-((4-Cloro-2-nitrofenil)sulfonyl)anilina (**89**)

Reactivos: **48** (0.7 mmol, 200.0 mg), Oxone® (0.6 mmol, 351.3 mg). Purificación: acetato de etilo/hexano (1:2).

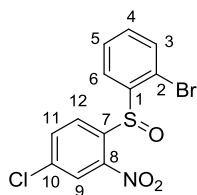


Primera fracción (88) Rendimiento: sólido naranja (38.6 mg, 18%). **P.f.** 164-165 °C. **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ 8.52 (d, J = 8.4 Hz, 1 H, H-12), 8.21 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, H-9), 7.93 (dd, J = 8.4, 2.1 Hz, 1 H, H-11), 7.42 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-2, H-6), 6.60 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-3, H-5), 5.74 (s, 2 H, H-13). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃): δ 149.8 (C-4), 144.9 (C-8), 143.0 (C-7), 137.4 (C-10), 135.0 (C-11), 132.4 (C-1), 128.9 (C-2, C-6), 127.6 (C-12), 125.4 (C-9), 114.7 (C-3, C-5). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (m/z): 297 [M + 1], 299 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₂H₉ClN₂O₃S) Calculado: %C 48.57, %H 3.06, %N 9.44, %S 10.80. Hallado: %C 48.62, %H 3.10, %N 9.40, %S 10.47.



Segunda fracción (89) Rendimiento: aceite amarillo (29.2 mg, 14%). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ 8.52 (d, J = 8.5 Hz, 1 H, H-12), 8.27 (d, J = 2.1 Hz, 1 H, H-9), 8.04 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-3, H-5), 8.00 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1 H, H-11), 7.93 (d, J = 8.6 Hz, 2 H, H-2, H-6), 5.25 (s, 2 H, H-13). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃): δ 163.8 (C-4), 151.6 (C-8), 145.7 (C-7), 141.9 (C-10), 139.1 (C-1), 136.2 (C-11), 128.4 (C-2, C-6), 128.0 (C-12), 126.0 (C-9), 121.8 (C-3, C-5).

2-Bromofenil 4-cloro-2-nitrofenil sulfóxido (90)



Reactivos: **50** (0.6 mmol, 200.0 mg), Oxone® (0.5 mmol, 285.9 mg).

Purificación: acetato de etilo/hexano (1:5). Rendimiento: sólido naranja (75.0 mg, 36%). **P.f.** 180-181 °C. **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ 8.50-8.45

(m, 1 H, H-12), 8.25-8.19 (m, 2 H, H-9, H-11), 7.84 (dd, *J* = 7.6, 1.6 Hz, 1 H, H-3), 7.48-7.42 (m, 2 H, H-4, H-5), 7.06 (dd, *J* = 7.4, 1.9 Hz, 1 H, H-6).

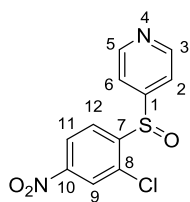
¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 145.3 (C-8), 144.9 (C-7), 139.6 (C-1), 137.0 (C-10), 135.7 (C-11), 133.6 (C-3), 133.5 (C-4), 129.6 (C-5), 129.3 (C-12), 127.7 (C-6), 125.7 (C-9), 123.3 (C-2). **Pureza por HPLC** >98%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 360 [M], 362 [M + 2], 364 [M + 4].

Análisis elemental (C₁₁H₇ClN₂O₃S) Calculado: %C 39.97, %H 1.96, %N 3.88, %S 8.89.

Hallado: %C 40.09, %H 2.01, %N 4.06, %S 8.93.

4-((2-Cloro-4-nitrofenil)sulfinil)piridina (91) y 4-((2-Cloro-4-nitrofenil)sulfinil)piridina (92)

Reactivos: **73** (0.5 mmol, 150.0 mg), Oxone® (0.5 mmol, 286.6 mg). Purificación: acetato de etilo/hexano (1:2).

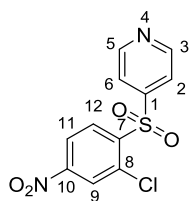


Primera fracción (91) Rendimiento: sólido amarillo (45 mg, 32%). **P.f.**

135-136 °C. **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ 8.65 (d, *J* = 6.2 Hz, 2 H, H-3, H-5), 8.38 (d, *J* = 8.7 Hz, 1 H, H-12), 8.21 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, H-9), 7.91 (dd, *J* = 8.7, 2.2 Hz, 1 H, H-11), 7.70 (d, *J* = 6.2 Hz, 2 H, H-2, H-6). **¹³C**

RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 153.0 (C-1), 151.0 (C-3, C-5), 150.0 (C-10), 149.5 (C-7), 131.8 (C-8), 126.8 (C-12), 125.4 (C-9), 123.2 (C-11), 118.8 (C-2, C-6).

Pureza por HPLC >97%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 283 [M + 1], 285 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₁H₇ClN₂O₃S) Calculado: %C 46.74, %H 2.50, %N 9.91, %S 11.34. Hallado: %C 46.78, %H 2.57, %N 9.91, %S 11.21.



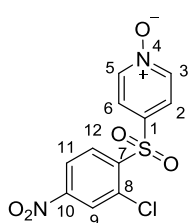
(92) Rendimiento: sólido amarillo (24.8 mg, 17%). **P.f.** 157-158 °C. **¹H**

RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.36 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H, H-12), 8.23 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, H-9), 8.11 (d, *J* = 6.2 Hz, 2 H, H-3, H-5), 7.93 (dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, 1 H, H-11), 7.59 (d, *J* = 6.2 Hz, 2 H, H-2, H-6). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃):

δ 144.8 (C-1), 141.5 (C-7), 141.1 (C-10), 140.0 (C-3, C-5), 139.0 (C-8), 136.1 (C-12), 127.2 (C-7), 125.7 (C-11), 123.7 (C-2, C-6). **Análisis elemental**

(C₁₁H₇ClN₂O₄S) Calculado: %C 44.23, %H 2.36, %N 9.38, %S 10.73. Hallado: %C 43.89, %H 2.52, %N 9.26, %S 10.46.

1.7. Síntesis del *N*-óxido de 4-[(2-Cloro-4-nitrofenil)sulfinil]piridina (93)



Sobre una disolución del derivado de diarilsulfuro correspondiente (0.6, 1 equiv, 200 mg) en 15 mL de metanol, se añade una disolución de Oxone® (1.0 mmol, 1.6 equiv, 573.2 mg) preparada en 15 mL de agua. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. A continuación, el crudo de reacción se lava con una disolución de

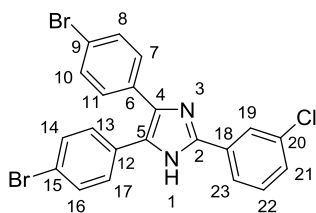
NaCl saturado y se purifica por cromatografía en columna empleando una mezcla de acetato de etilo/hexano (1:2) como eluyentes, en las proporciones indicadas en cada caso, obteniéndose así el producto deseado. Rendimiento: sólido amarillo pálido (112.0 mg, 60%). **P.f.** 174-175 °C. **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ 8.55 (d, *J* = 6.2 Hz, 2 H, H-3, H-5), 8.36-8.32 (m, 2 H, H-9, H-11), 8.23 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, H-12), 7.80 (d, *J* = 6.2 Hz, 2 H, H-2, H-6). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃): δ 151.2 (C-1), 142.5 (C-7), 139.9 (C-12), 134.4 (C-10), 133.6 (C-8), 132.4 (C-3, C-5), 127.4 (C-9 o C-11), 126.1 (C-2, C-6), 122.4 (C-9 o C-11). **Pureza por HPLC** >96%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 315 [M + 1], 317 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₁₁H₇ClN₂O₅S) Calculado: %C 41.98, %H 2.24, %N 8.90, %S 10.19. Hallado: %C 42.28, %H 2.52, %N 9.26, %S 10.46.

1.8. Síntesis de derivados de imidazol

1.8.1. Síntesis de imidazoles trisustituídos

En un vial de microondas se adicionan el derivado de 1,2-dicetona (1 equiv), el aldehído correspondiente (1 equiv), acetato de amonio (10 equiv) y ácido acético (por cada 0.2 mmol de aldehído se adiciona 1 mL de ácido acético). La mezcla de reacción se agita bajo irradiación microondas durante 5 min a 180 °C. A continuación, el crudo de reacción se adiciona sobre amoníaco a 0 °C y el precipitado formado se filtra y se lava con agua a 0 °C. El sólido se purifica mediante cromatografía en columna automática usando el equipo IsoleraOne, empleando la mezcla de eluyentes especificada, obteniéndose así el producto deseado en cada caso.

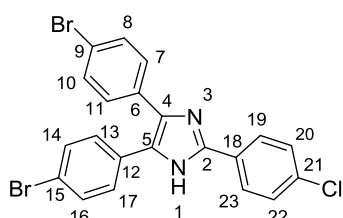
4,5-bis-(4-Bromofenil)-2-(3-clorofenil)-1*H*-imidazol (94)



Reactivos: 1,2-bis(4-bromofenil)etano-1,2-diona (0.5 mmol, 200.0 mg), 3-clorobenzaldehído (0.5 mmol, 76.4 mg), acetato de amonio (5.4 mmol, 418.9 mg). Purificación: diclorometano. Rendimiento: sólido blanco (264.0 mg, 73%). **P.f.** 281 °C. **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.90 (s, 1 H, H-1), 8.09 (t, *J* = 1.6 Hz, 1 H, H-19), 7.99 (dt, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1 H, H-23), 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-14, H-16), 7.52-7.47 (m, 2 H, H-ar), 7.46-7.39 (m, 6 H, H-ar). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ

145.2 (C-2), 137.3 (C-4), 134.5 (C-6), 134.3 (C-21), 132.5 (C-14, C-16), 132.0 (2 C-ar), 131.4 (C-ar), 131.0 (2 C-ar), 130.3 (C-12), 129.8 (2 C-ar), 128.9 (C-ar), 125.4 (C-19), 124.5 (C-23), 120.6 (C-ar). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (m/z): 487 [M - 1], 489 [M + 1], 491 [M + 3], 493 [M + 5]. **Análisis elemental** (C₂₁H₁₃Br₂ClN₂) Calculado: %C 51.62, %H 2.68, %N 5.73. Hallado: %C 51.33, %H 2.55, %N 5.60.

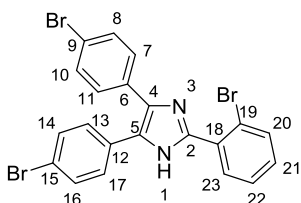
4,5-bis-(4-Bromofenil)-2-(4-clorofenil)-1H-imidazol (95)



Reactivos: 1,2-bis(4-bromofenil)etano-1,2-diona (0.5 mmol, 200.0 mg), 4-clorobenzaldehído (0.5 mmol, 76.4 mg), acetato de amonio (5.4 mmol, 418.9 mg). Purificación: diclorometano. Rendimiento: sólido blanco (100.0 mg, 40%). **P.f.** 318-319 °C.

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.86 (s, 1 H, H-1), 8.06 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-19, H-23), 7.68-7.60 (m, 2 H, H-ar), 7.53 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-20, H-22), 7.52-7.39 (m, 6 H, H-ar). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 145.7 (C-2), 137.2 (C-4), 134.6 (C-6), 133.7 (C-ar), 133.3 (C-21), 132.4 (2 C-ar), 132.0 (2 C-ar), 131.0 (2 C-ar), 130.4 (C-ar), 129.8 (2 C-ar), 129.5 (C-19, C-23), 128.4 (C-ar), 127.6 (C-20, C-22), 121.6 (C-ar), 120.6 (C-ar). **Pureza por HPLC** >97%. **EM** (ESI+) (m/z): 487 [M - 1], 489 [M + 1], 491 [M + 3], 493 [M + 5]. **Análisis elemental** (C₂₁H₁₃Br₂ClN₂) Calculado: %C 51.62, %H 2.68, %N 5.73. Hallado: %C 51.55, %H 2.71, %N 5.80.

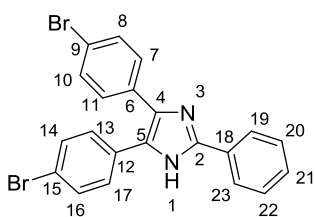
4,5-bis-(4-Bromofenil)-2-(2-bromofenil)-1H-imidazol (96)



Reactivos: 1,2-bis(4-bromofenil)etano-1,2-diona (0.5 mmol, 200.0 mg), 2-bromobenzaldehído (0.5 mmol, 100.6 mg), acetato de amonio (5.4 mmol, 418.9 mg). Purificación: metanol/diclorometano (1:50). Rendimiento: sólido blanco (188.0 mg, 70%). **P.f.** 196-197 °C. **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ

12.74 (s, 1 H, H-1), 7.75 (dd, J = 8.1, 1.2 Hz, 1 H, H-20), 7.69 (d, J = 7.7, 1.8 Hz, 1 H, H-23), 7.61 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-14, H-16), 7.50 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-7, H-11), 7.49-7.47 (m, 1 H, H-22), 7.45 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-8, H-10), 7.41 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-13, H-17), 7.36 (td, J = 7.7, 1.8 Hz, 1 H, H-21). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 145.9 (C-2), 136.6 (C-4), 134.8 (C-6), 134.1 (C-20), 132.6 (C-18), 132.5 (C-23), 132.4 (C-14, C-16), 132.0 (C-7, C-11), 131.4 (C-21), 130.8 (C-13, C-17), 130.4 (C-5), 130.1 (C-12), 129.8 (C-8, C-10), 128.4 (C-22), 127.8 (C-15), 122.3 (C-19), 120.5 (C-9). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (m/z): 531 [M - 2], 533 [M], 535 [M + 1], 537 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₂₁H₁₃Br₃N₂) Calculado: %C 47.32, %H 2.46, %N 5.26. Hallado: %C 47.08, %H 2.50, %N 5.31.

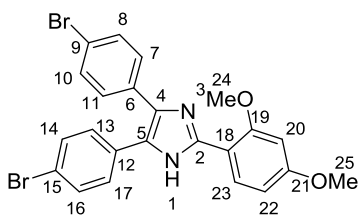
4,5-bis-(4-Bromofenil)-2-fenil-1H-imidazol (97)



Reactivos: 1,2-bis(4-bromofenil)etano-1,2-diona (0.5 mmol, 200 mg), benzaldehído (0.5 mmol, 57.6 mg), acetato de amonio (5.4 mmol, 418.9 mg). Purificación: acetato de etilo/hexano (1:5). Rendimiento: sólido blanco (184.0 mg, 75%). **P.f.** 320-321 °C.

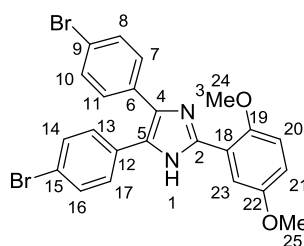
¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.80 (s, 1 H, H-1), 8.05 (dd, *J* = 7.1, 1.5 Hz, 2 H, H-19, H-23), 7.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-14, H-16), 7.51 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-8, H-10), 7.49-7.45 (m, 4 H, H-ar), 7.43 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-13, H-17), 7.41-7.34 (m, 1 H, H-21). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 146.8 (C-2), 137.1 (C-4), 134.6 (C-6), 132.4 (C-14, C-16), 132.0 (C-8, C-10), 131.1 (C-13, C-17), 130.7 (2 C-ar), 130.6 (C-ar), 129.8 (2 C-ar), 129.7 (C-12), 129.4 (C-21), 129.2 (C-ar), 128.1 (C-ar), 126.0 (C-19, C-23), 120.5 (C-ar). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 453 [M - 1], 455 [M + 1], 457 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₂₁H₁₄Br₂N₂) Calculado: %C 55.54, %H 3.11, %N 6.17. Hallado: %C 55.29, %H 3.00, %N 6.24.

4,5-bis-(4-Bromofenil)-2-(2,4-dimetoxifenil)-1H-imidazol (98)

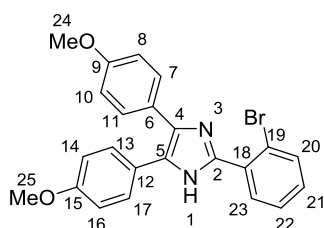


Reactivos: 1,2-bis(4-bromofenil)etano-1,2-diona (0.7 mmol, 250.0 mg), 2,4-dimetoxibenzaldehído (0.7 mmol, 112.9 mg), acetato de amonio (6.8 mmol, 523.4 mg). Purificación: metanol/diclorometano (1:20). Rendimiento: sólido blanco (270.0 mg, 78%). **P.f.** 204-205 °C. **¹H RMN** (400 MHz,

DMSO-*d*₆): δ 11.84 (s, 1 H, H-1), 7.90 (d, *J* = 8.6 Hz, 1 H, H-23), 7.59 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-14, H-16), 7.47 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H, H-8, H-10), 7.41 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H, H-7, H-11), 7.36 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-13, H-17), 6.66 (d, *J* = 2.3 Hz, 1 H, H-20), 6.65-6.60 (m, 1 H, H-22), 3.87 (s, 3 H, OCH₃), 3.80 (s, 3 H, OCH₃). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 161.7, 157.9 (C-19, C-21), 144.6 (C-2), 136.0 (C-4), 135.0 (C-6), 132.2 (C-8, C-10), 131.9 (C-14, C-16), 131.3 (C-13, C-17), 130.9 (C-ar), 130.6 (C-23), 129.8 (C-12), 129.7 (C-7, C-11), 126.8 (C-ar), 120.2 (C-9), 112.3 (C-18), 106.3 (C-22), 99.0 (C-20), 56.3, 56.1 (C-24, C-25). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 513 [M - 1], 515 [M + 1], 517 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₂₃H₁₈Br₂N₂O₂) Calculado: %C 53.72, %H 3.53, %N 5.45. Hallado: %C 53.65, %H 3.74, %N 5.70.

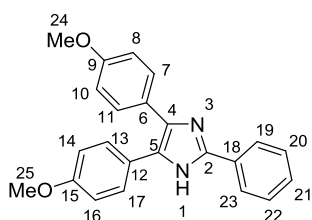
4,5-bis-(4-Bromofenil)-2-(2,5-dimetoxifenil)-1H-imidazol (99)

Reactivos: 1,2-bis(4-bromofenil)etano-1,2-diona (0.7 mmol, 250.0 mg), 2,5-dimetoxibenzaldehído (0.7 mmol, 112.9 mg), acetato de amonio (6.8 mmol, 523.4 mg). Purificación: acetato de etilo/hexano (1:5). Rendimiento: sólido blanco (199.0 mg, 59%). **P.f.** 190-191 °C. **¹H RMN** (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.01 (s, 1 H, H-1), 7.63 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-14, H-16), 7.56 (d, *J* = 3.2 Hz, 1 H, H-23), 7.50 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-8, H-10), 7.44 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-7, H-11), 7.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H-13, H-17), 7.09 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H, H-20), 6.96 (dd, *J* = 9.0, 3.2 Hz, 1 H, H-21), 3.85 (s, 3 H, OCH₃), 3.77 (s, 3 H, OCH₃). **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 153.0 (C-22), 150.3 (C-19), 143.5 (C-2), 135.6 (C-4), 134.1 (C-6), 131.6 (C-7, C-11), 131.2 (C-14, C-16), 130.7 (C-8, C-10), 130.0 (C-5), 129.9 (C-12), 129.0 (C-13, C-17), 126.8 (C-15), 119.6 (C-9), 119.1 (C-18), 115.3 (C-21), 113.5 (C-23), 112.8 (C-20), 55.9, 55.5 (C-24, C-25). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 513 [M - 1], 515 [M + 1], 517 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₂₃H₁₈Br₂N₂O₂) Calculado: %C 53.72, %H 3.53, %N 5.45. Hallado: %C 53.95, %H 3.60, %N 5.61.

2-(2-Bromofenil)-4,5-bis-(4-metoxifenil)-1H-imidazol (100)

Reactivos: 1,2-bis(4-metoxifenil)etano-1,2-diona (1.1 mmol, 300.0 mg), 2-bromobenzaldehído (1.1 mmol, 205.4 mg), acetato de amonio (11.1 mmol, 855.6 mg). Purificación: acetato de etilo/hexano (1:5). Rendimiento: sólido amarillo (338.0 mg, 70%). **P.f.** 142-143 °C. **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.41 (s, 1 H, H-1), 7.75 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1 H, H-20), 7.69 (dd, *J* = 7.5, 1.7 Hz, 1 H, H-23), 7.49 (ddd, *J* = 8.0, 7.5, 1.2 Hz, 1 H, H-22), 7.45 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, H-13, H-17), 7.39 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, H-7, H-11), 7.35 (ddd, *J* = 8.0, 7.5, 1.7 Hz, 1 H, H-21), 6.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, H-8, H-10), 6.86 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, H-14, H-16), 3.77 (s, 3 H, OCH₃), 3.73 (s, 3 H, OCH₃). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 159.4 (C-9), 158.6 (C-15), 144.6 (C-2), 136.6 (C-4), 134.0 (C-20), 133.0 (C-18), 132.4 (C-23), 130.9 (C-21), 130.1 (C-7, C-11), 128.9 (C-13, C-17), 128.5 (C-12), 128.3 (C-22), 127.5 (C-5), 124.1 (C-6), 122.2 (C-19), 114.8 (C-8, C-10), 114.3 (C-14, C-16), 55.9, 55.7 (C-24, C-25). **Pureza por HPLC** >96%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 435 [M], 437 [M + 2], 438 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₂₃H₂₀N₂O₂) Calculado: %C 77.51, %H 5.66, %N 7.86. Hallado: %C 77.45, %H 5.70, %N 7.92.

2-Fenil-4,5-bis(4-metoxifenil)-1H-imidazol (101)



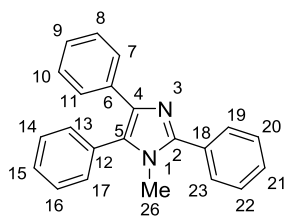
Reactivos: 1,2-bis(4-metoxifenil)etano-1,2-diona (0.9 mmol, 250.0 mg), benzaldehído (0.9 mmol, 98.2 mg), acetato de amonio (9.3 mmol, 719.7 mg). Purificación: acetato de etilo/hexano (1:5). Rendimiento: sólido blanco (265.0 mg, 83%).

P.f. 199 °C. **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.49 (s, 1 H, H-1), 8.03 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 2 H, H-19, H-23), 7.47-7.42 (m, 4 H, H-ar), 7.38 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H, H-7, H-11), 7.34-7.28 (m, 1 H, H-21), 6.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, H-8, H-10), 6.85 (d, *J* = 8.8, 2 H, H-14, H-16), 3.76 (s, 3 H, OCH₃), 3.71 (s, 3 H, OCH₃). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 159.4 (C-9), 158.6 (C-15), 145.5 (C-2), 137.1 (C-4), 131.2 (C-ar), 130.4 (C-7, C-11), 129.3 (2C-ar), 128.8 (2C-ar), 128.7 (C-21), 128.5 (C-12), 127.9 (C-5), 125.7 (C-19, C-23), 124.2 (C-6), 114.8 (C-8, C-10), 114.3 (C-14, C-16), 55.8, 55.7 (C-24, C-25). **Pureza por HPLC** >95%. **EM** (ESI+) (*m/z*): 357 [M + 1]. **Análisis elemental** (C₂₃H₂₀N₂O₂) Calculado: %C 77.51, %H 5.66, %N 7.86. Hallado: %C 77.45, %H 5.70, %N 7.92.

1.8.2. Síntesis de imidazoles *N*-alquilados

Se prepara una mezcla del imidazol correspondiente (1 equiv) e hidróxido de potasio (1.25 equiv) en etanol (10 mL). Tras 20 minutos de agitación a temperatura ambiente, se añade el sulfato de dietilo (1 equiv) y la mezcla de reacción resultante se agita durante toda la noche a temperatura ambiente. Tras ese tiempo, el crudo de reacción se lava con una disolución de NaCl saturada. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico anhidro y se purifica mediante cromatografía en columna flash empleando los eluyentes indicados en cada caso, obteniéndose así los productos deseados.

2,4,5-Trifenil-1-metilimidazol (102)



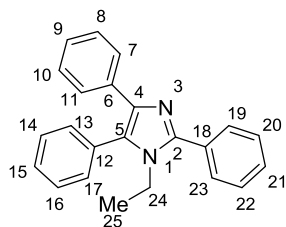
Reactivos: 2,4,5-trifenil-1H-imidazol (1.0 mmol, 300 mg), hidróxido de potasio (1.3 mmol, 70.8 mg), sulfato de dimetilo (1.0 mmol, 126.1 mg). Purificación: metanol/diclorometano (1:20). Rendimiento: sólido blanco (96.0 mg, 40%). **P.f.** 143-144 °C (lit.¹⁷¹ 143-144 °C). **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.80 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 2 H, H-19, H-23), 7.64-7.47 (m, 5 H, H-ar), 7.48-7.27 (m, 5 H, H-ar), 7.27-7.10 (m, 3 H, H-ar), 3.47 (s, 3 H, H-18).

¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 146.8 (C-2), 135.8 (C-4), 131.4 (2 C-ar), 131.3 (C-ar), 129.9 (2 C-ar), 129.8 (C-19, C-23), 129.5 (C-ar), 129.4 (2 C-ar), 129.2 (C-ar), 129.0 (2 C-ar), 128.7 (C-ar), 128.4 (C-ar), 127.7 (C-ar), 127.3 (2 C-ar),

¹⁷¹ Balalaie, S.; Arabanian, A. "One-pot synthesis of tetrasubstituted imidazoles catalyzed by zeolite HY and silica gel under microwave irradiation" *Green Chem.*, **2000**, 2, 274-276.

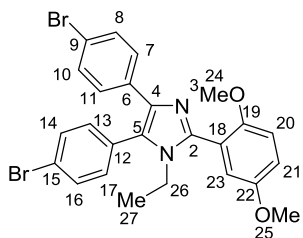
126.4 (C-ar), 34.0 (C-26). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (m/z): 311 [M + 1]. **Análisis elemental** (C₂₂H₁₈N₂) Calculado: %C 85.13, %H 5.85, %N 9.03. Hallado: %C 84.98, %H 5.78, %N 8.89.

1-Etil-2,4,5-trifenilimidazol (103)



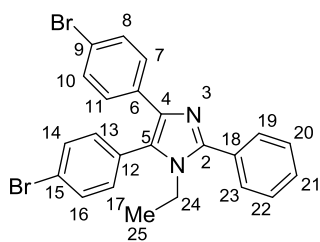
Reactivos: 2,4,5-trifenil-1*H*-imidazol (1.0 mmol, 300 mg), hidróxido de potasio (1.3 mmol, 70.8 mg), sulfato de dietilo (1.0 mmol, 156.1 mg). Purificación: acetato de etilo/hexano (1:10). Rendimiento: sólido blanco (180.0 mg, 56%). **P.f.** 115-116 °C. (lit.¹⁷⁰ 115-117 °C). **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.71 (dd, J = 8.2, 1.5 Hz, 2 H, H-19, H-23), 7.57-7.49 (m, 6 H, H-ar), 7.46 (dd, J = 7.6, 1.9 Hz, 2 H, H-13, H-17), 7.38 (dd, J = 8.4, 1.3 Hz, 2 H, H-7, H-11), 7.20-7.07 (m, 3 H, H-ar), 3.90 (q, J = 7.1 Hz, 2 H, H-24), 0.91 (t, 3 H, H-25). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 147.0 (C-2), 137.2 (C-4), 135.3 (C-ar), 131.8 (C-ar), 131.7 (C-ar), 131.6 (2 C-ar), 130.2 (C-5), 129.9 (C-7, C-11), 129.6 (C-ar), 129.5 (C-ar), 129.4 (4 C-ar), 128.7 (2 C-ar), 126.8 (C-ar), 126.7 (C-19, C-23), 40.3 (C-24), 16.4 (C-25). **Pureza por HPLC** >99%. **EM** (ESI+) (m/z): 325 [M + 1]. **Análisis elemental** (C₂₂H₁₈N₂) Calculado: %C 85.15, %H 6.21, %N 8.63. Hallado: %C 85.04, %H 6.05, %N 8.60.

4,5-bis-(4-Bromofenil)-1-etil-2-(2,5-dimetoxifenil)imidazol (104)



Reactivos: 4,5-bis-(4-bromofenil)-2-(2,5-dimetoxifenil)-1*H*-imidazol (**99**) (160 mg, 0.3 mmol), hidróxido de potasio (21.8 mg, 0.4 mmol), sulfato de dietilo (48.0 mg, 0.3 mmol). Purificación: hexano/diclorometano/acetato de etilo (3:4:1). Rendimiento: sólido blanco (99.0 mg, 60%). **P.f.** 196-197 °C. **¹H RMN** (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.71 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-14, H-16), 7.40 (d, J = 6.2 Hz, 2 H, H-8, H-10), 7.38 (d, J = 6.2 Hz, 2 H, H-7, H-11), 7.27 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, H-13, H-17), 7.10 (d, J = 9.0 Hz, 1 H, H-23), 7.05 (dd, J = 9.0, 3.0 Hz, 1 H, H-21), 6.97 (d, J = 3.0 Hz, 1 H, H-20), 3.73 (s, 6 H, H-24, H-25), 3.66 (q, J = 7.1 Hz, 2 H, H-26), 0.78 (t, J = 7.1 Hz, 3 H, H-27). **¹³C RMN** (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 154.2, 151.8 (C-19, C-22), 146.8 (C-2), 137.1 (C-4), 133.3 (C-ar), 132.8 (4 C-ar), 132.1 (C-8, C-10), 132.0 (C-13, C-17), 129.5 (C-ar), 129.4 (C-ar), 128.3 (C-ar), 126.0, 117.7 (2 C-ar), 113.2 (C-ar), 56.7, 56.6 (C-24, C-25), 41.0 (C-26), 16.0 (C-27). **Pureza por HPLC** >98%. **EM** (ESI+) (m/z): 541 [M - 1], 543 [M + 1], 545 [M + 3]. **Análisis elemental** (C₂₅H₂₂Br₂N₂O₂) Calculado: %C 55.37, %H 4.09, %N 5.17. Hallado: %C 55.18, %H 3.99, %N 5.02.

4,5-bis-(4-Bromofenil)-1-etil-2-fenilimidazol (105)

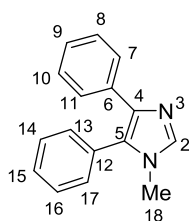


Reactivos: 4,5-bis-(4-bromofenil)-2-fenil-1*H*-imidazol (**97**) (149 mg, 0.3 mmol), hidróxido de potasio (23.0 mg, 0.4 mmol), sulfato de dietilo (46.2 mg, 0.3 mmol). Purificación: hexano/diclorometano/acetato de etilo (3:4:1). Rendimiento: sólido blanco (65.0 mg, 42%). **P.f.** 188-189 °C. **¹H RMN** (400

MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.10 (dd, *J* = 7.4, 1.6 Hz, 2 H, H-19, H-23), 7.58-7.49 (m, 5 H, H-ar), 7.46 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-8, H-10), 7.41 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-14, H-16), 7.36 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H, H-13, H-17), 3.69 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, H-24), 0.91 (t, 3 H, H-25). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 146.9 (C-2), 137.5 (C-4), 133.9 (2 C-ar), 132.8 (2 C-ar), 132.1 (C-8, C-10), 132.0 (C-13, C-17), 131.5 (C-ar), 130.9 (C-ar), 129.7 (2 C-ar), 129.6 (2 C-ar), 129.4 (C-ar), 126.2 (C-ar), 117.7 (C-ar), 113.2 (C-ar), 106.4 (C-ar), 42.1 (C-24), 16.8 (C-25).

Análisis elemental (C₂₃H₁₈Br₂N₂) Calculado: %C 57.29, %H 3.76, %N 5.81. Hallado: %C 57.25, %H 3.83, %N 5.88.

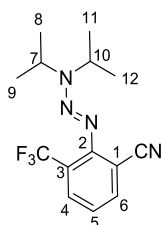
4,5-Difenil-1-metilimidazol (106)



Reactivos: 4,5-difenil-1*H*-imidazol (250 mg, 1.1 mmol), hidróxido de potasio (77.1 mg, 1.4 mmol), sulfato de dimetilo (138.7 mg, 1.1 mmol). Purificación: diclorometano/metanol (20:1). Rendimiento: sólido blanco (64.0 mg, 25%). **P.f.** 163-164 °C (lit.¹⁷² 162-164 °C).

1.9. Síntesis en disolución de la *N*-[7-(trifluorometil)-1*H*-indazol-3-il]benzamida¹⁵¹ (110)

3-(Trifluorometil)-2-(3,3-diisopropil-1-triazenil)benzonitrilo¹⁵¹ (107)



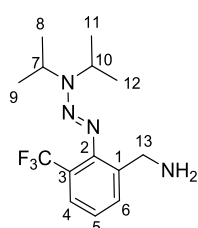
Se prepara una disolución del 2-amino-3-trifluorometilbenzonitrilo (16.1 mmol, 3 equiv, 3.0 g) y BF₃·OEt₂ (26.9 mmol, 5 equiv, 3.8 g, 3.3 mL) en THF anhidro y se enfría hasta -20 °C. Tras 10 minutos de agitación a dicha temperatura, se añade isoamilnitrito (26.9 mmol, 5 equiv, 3.1 g, 3.6 mL) y se agita la mezcla de reacción durante 2 horas. La sal de diazonio formada

(1 equiv) se disuelve en acetonitrilo y se añade sobre una disolución de diisopropilamina (16.1 mmol, 1 equiv, 1.6 g, 2.3 mL) en una mezcla de THF/piridina (9:1) a -20 °C. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. Tras este tiempo, se

¹⁷² Bellina, F.; Cauteruccio, S.; Di Fiore, A.; Rossi, R. "Regioselective synthesis of 4,5-diaryl-1-methyl-1*H*-imidazoles including highly cytotoxic derivatives by Pd-catalyzed direct C-5 arylation of 1-methyl-1*H*-imidazole with aryl bromides" *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 32, 5436-5445.

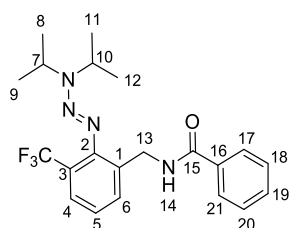
elimina el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna empleando como eluyentes acetato de etilo/ciclohexano (1:4) para obtener el producto deseado. Rendimiento: sólido amarillo (2.3 g, 50%). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ 7.72 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, H-4), 7.68 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, H-6), 7.10 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H, H-5), 5.09 (hept, *J* = 6.8 Hz, 1 H, CH), 4.05 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1 H, CH), 1.39 (d, *J* = 6.7 Hz, 6 H, CH₃), 1.24 (d, *J* = 6.8 Hz, 6 H, CH₃). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃): δ 152.5 (C-2), 138.1 (C-6), 130.5 (q, *J* = 5.6 Hz, C-4), 127.1 (q, *J* = 273.5 Hz, CF₃), 124.8 (q, *J* = 30.4 Hz, C-3), 123.3 (C-5), 119.0 (CN), 103.1 (C-1), 51.3 (CH), 48.4 (CH), 23.2 (2 CH₃), 18.9 (2 CH₃). **EM** (IE) (*m/z*): 298 [M]. **Análisis elemental** (C₁₄H₁₇F₃N₄) Calculado: %C 56.37, %H 5.74, %N 18.78. Hallado: %C 56.19, %H 5.62 %N 18.74. **IR** (ATR): ν 3257 (NH), 2235 (CN), 1652, 1604, 1550, 1509, 1466, 1422, 1325 (N=N), 1274, 1217, 1150, 1113, 1089, 1054, 929, 908, 805, 786, 753, 717, 690, 656, 598, 564, 545, 403 cm⁻¹.

3-(Trifluorometil)-2-(3,3-diisopropil-1-triazenil)bencilamina¹⁵¹ (**108**)



Se prepara una disolución del derivado **107** (7.4 mmol, 1 equiv, 2.2 g) en THF anhidro y se enfría a 0 °C. Se añade la disolución de hidruro de litio y aluminio (1M en THF) (17.8 mmol, 2 equiv, 5.6 g, 14.8 mL) y la mezcla de reacción se agita a 70 °C durante 12 horas. Tras este tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna empleando como eluyentes metanol/diclorometano (1:10) para obtener el producto deseado. Rendimiento: sólido amarillo pálido (1.07 g, 48%). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ 7.62 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, H-4), 7.56 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, H-6), 7.23 (t, *J* = 7.8 Hz, 1 H, H-5), 5.26 (hept, *J* = 6.6 Hz, 1 H, CH), 4.08 (hept, *J* = 6.8 Hz, 1 H, CH), 3.66 (s, 2 H, CH₂), 1.42 (d, *J* = 6.6 Hz, 6 H, CH₃), 1.34 (d, *J* = 6.8 Hz, 6 H, CH₃). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃): δ 147.7 (C-2), 138.7 (C-6), 129.9 (q, *J* = 5.6 Hz, C-4), 128.3 (q, *J* = 273.5 Hz, CF₃), 127.6 (C-5), 124.8 (q, *J* = 30.4 Hz, C-3), 117.7 (C-1), 54.0 (CH), 50.9 (CH), 44.1 (CH₂), 24.0 (2 CH₃), 19.2 (2 CH₃). **EM** (IE) (*m/z*): 302 [M]. **Análisis elemental** (C₁₄H₂₁F₃N₄) Calculado: %C 55.62, %H 7.00, %N 18.53. Hallado: %C 55.99, %H 7.12 %N 18.66. **IR** (ATR), ν = 3052 (NH₂), 1639, 1595, 1403, 1365, 1315 (N=N), 1269, 1225, 1194, 1125, 1030, 869, 806, 779, 762, 684, 665, 548 cm⁻¹.

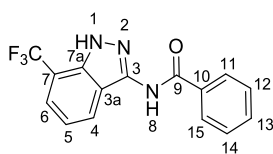
N-[3-(Trifluorometil)-2-(3,3-diisopropil-1-triazenil)bencil]benzamida¹⁵¹ (**109**)



Se prepara una disolución del derivado **108** (3.3 mmol, 1 equiv, 1.0 g) y trietilamina (9.9 mmol, 3 equiv, 1.0 g, 1.4 mL) en THF anhidro. A continuación, se añade el cloruro de benzoilo (7.3 mmol, 2.2 equiv, 1.0 g, 0.8 mL) y la mezcla de reacción se agita

durante 12 horas a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida, el crudo de reacción se redisuelve en acetato de etilo y se lava 3 veces con una disolución de NaCl saturada. La fase orgánica se seca sobre sulfato magnésico anhidro, y se purifica por cromatografía en columna, empleando como eluyente diclorometano, obteniéndose así el producto deseado. Rendimiento: sólido blanco (912.0 mg, 68%). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ 7.67 (d, *J* = 7.0 Hz, 2 H, H-17, H-21), 7.54 (t, *J* = 7.0 Hz, 2 H, H-18, H-20), 7.47-7.22 (m, 3 H, H-ar), 7.12 (t, *J* = 7.7 Hz, 1 H, H-6), 6.48 (s, 1 H, H-14), 5.10 (hept, *J* = 6.7 Hz, 1 H, CH), 4.51 (d, *J* = 5.6 Hz, 2 H, H-13), 3.94 (hept, *J* = 6.8 Hz, 1 H, CH), 1.24 (d, *J* = 6.7 Hz, 6 H, CH₃), 1.19 (d, *J* = 6.8 Hz, 6 H, CH₃). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃): δ 167.1 (C-15), 149.5 (C-2), 134.5 (C-16), 133.8 (C-6), 131.5 (C-ar), 128.5 (C-17, C-21), 126.9 (C-18, C-20), 126.3 (q, *J* = 5.5 Hz, C-4), 125.6 (q, *J* = 273.4 Hz, CF₃), 124.4 (C-5), 123.5 (q, *J* = 30.0 Hz, C-3), 49.5 (CH), 46.5 (CH), 41.1 (CH₂), 23.3 (2 CH₃), 19.1 (2 CH₃). **EM** (EI) (*m/z*): 406 [M]. **Análisis elemental** (C₂₁H₂₅F₃N₄O): Calculado %C 62.06, %H 6.20, %N 13.78. Hallado %C 61.80, %H 5.95, %N 13.66. **IR** (ATR): ν = 3354 (NH), 2983, 1639 (CO), 1577 (NH), 1537, 1488, 1400, 1365, 1314 (N=N), 1268, 1225, 1190, 1114, 1095, 1029, 989, 867, 807, 770, 753, 715, 697, 651, 523 cm⁻¹.

***N*-[7-(Trifluorometil)-1*H*-indazol-3-il]benzamida¹⁵¹ (**110**).**

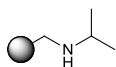


Se prepara una disolución del derivado **109** (2.1 mmol, 1 equiv, 850.0 mg) en diclorometano anhidro y bajo atmósfera de nitrógeno. A continuación, se añade el ácido trifluoroacético (4.4 mmol, 2.1 equiv, 500.7 mg, 0.3 mL) y la mezcla de reacción se agita durante

12 horas a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía en columna, empleando como eluyentes acetato de etilo/hexano (1:2), obteniéndose el producto deseado. Rendimiento: sólido blanco (340.0 mg, 53%). **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.40 (s, 1H, NH), 11.00 (s, 1H, NH), 8.10 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-12, H-14), 8.07 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-6), 7.79 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-4), 7.65 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-5), 7.57 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H, H-11, H-15), 7.28 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 H, H-13). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.8 (C-9), 141.1 (C-3), 135.6 (q, *J* = 5.0 Hz, C-7a), 133.4 (C-10), 132.0 (C-13), 128.4 (C-12, C-14), 127.9 (C-11, C-15), 127.1 (C-5), 124.4 (q, *J* = 4.5 Hz, C-6), 124.0 (q, *J* = 271.3 Hz, CF₃), 119.2 (C-4), 118.8 (C-3a), 111.5 (q, *J* = 35.1 Hz, C7). **EM** (EI) (*m/z*): 305 (70) [M]⁺, 105 (100), 77 (20). **HRMS** (C₁₅H₁₀F₃N₃O) [M]: calculado: 305.0772, hallado: 305.0770. **Análisis elemental** (C₁₅H₁₀F₃N₃O): Calculado %C 59.02, %H 3.30, %N 13.77. Hallado %C 58.86, %H 3.01, %N 13.77. **IR** (ATR): ν = 3257.4 (NH), 1652.4 (CO), 1603.8 (NH), 1549.5, 1508.7, 1465.6, 1421.7, 1325.2, 1274.1, 1216.6, 1150.2, 1112.7, 1088.5, 1053.8, 928.6, 907.8, 805.3, 785.6, 752.9, 716.6, 690.2, 655.5, 598.3, 563.6, 545.3, 403.1 cm⁻¹.

1.10. Síntesis en fase sólida de derivados de indazol/benzotriazina

1.10.1. Síntesis de *N,N*-isopropilpoliestirilmetilamina (R3)



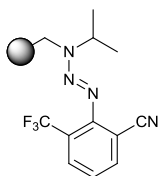
Sobre una suspensión de 12.00 g de la resina de Merrifield (11.28 mmol, 1 equiv) en DMF, se añaden 4.2 mL de la isopropilamina (67.68 mmol, 6 equiv) y 2.06 g de yoduro de potasio (12.41 mmol, 1.1 equiv). La mezcla resultante se mantiene en agitación orbital a 80 °C durante 12 horas. Tras este tiempo, la mezcla se deja enfriar a temperatura ambiente y se lava la resina siguiendo el siguiente procedimiento secuencial de lavado: Agua x 3, metanol x 3, acetona x 3 y diclorometano x 3. Tras los lavados, la resina se seca a vacío, obteniéndose 12.12 g de la resina **R3**. IR (cm⁻¹): ν = 3024 (ps), 2919 (ps), 2847 (ps), 1600 (ps), 1491 (ps), 1450 (ps), 1362, 1027, 905, 754, 695, 536. **Análisis elemental** (C₁₅₆H₁₅₆N): Calculado %C 91.38, %H 7.96, %N 0.67. Hallado: %C 90.04, %H 7.90, %N 0.66. Carga: 0.7557 mmol/g.

1.10.2. Síntesis de las resinas funcionalizadas con el conector T1 (R17-R39)

Procedimiento general para la formación del conector de triazeno T1 (R5, R17-R23)

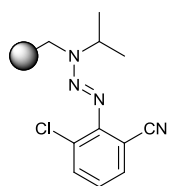
Se prepara una disolución de la amina correspondiente (3 equiv) y BF₃·OEt₂ (5 equiv) en THF anhidro, y se enfría hasta -20 °C. Tras 10 minutos de agitación, se añade isoamilnitrito (5 equiv) y se agita la mezcla de reacción -20 °C durante 2 horas. La sal de diazonio así formada (3 equiv) se disuelve en acetonitrilo y se añade sobre una suspensión de la resina **R3** (1 equiv), en una mezcla THF/piridina (9:1). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. Tras este tiempo, se lava la resina siguiendo el siguiente procedimiento secuencial de lavado: THF x 3, metanol x 3, acetona x 3 y diclorometano x 3, y se seca a vacío.

3-(Trifluorometil)-2-(3-isopropil-3-poliestirilmetil-1-triazen-1-il)benzonitrilo (R5)



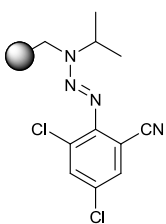
Siguiendo la metodología general, 3.1 g (10.8 mmol) de 2-amino-3-(trifluorometil)benzonitrilo y 4.73 g (3.6 mmol) de resina **R3** se convierten en 5.14 g de resina **R5**. IR (cm⁻¹): ν = 3024 (ps), 2920 (ps), 2847 (ps), 2235 (CN), 1600 (ps), 1492 (ps), 1451 (ps), 1390 (N=N), 1317 (N=N), 1231, 1137, 1027, 753, 695, 537. **Análisis elemental** (C₁₈₃H₁₈₃F₃N₄): Calculado %C 88.08, %H 7.39, %N 2.25. Hallado: %C 83.83, %H 7.30, %N 1.68. Carga: 0.4379 mmol/g.

3-Cloro-2-(3-isopropil-3-poliestirilmetil-1-triazen-1-il)benzonitrilo (R17)



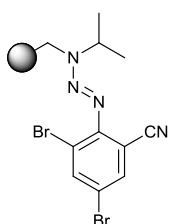
Siguiendo la metodología general, 603.3 mg (2.4 mmol) de 2-amino-3-clorobenzonitrilo y 1.00 g (0.8 mmol) de resina **R3** se convierten en 1.05 g de resina **R17**. IR (cm^{-1}): $\nu = 3024$ (ps), 2916 (ps), 2240 (CN), 1600 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1390 (N=N), 1229, 1172, 1065, 1027, 905, 843, 748, 695, 535. **Análisis elemental** ($\text{C}_{206}\text{H}_{207}\text{ClN}_4$): Calculado %C 89.18, %H 7.52, %N 2.02. Hallado: %C 83.59, %H 7.27, %N 1.57. Carga: 0.3022 mmol/g.

3,5-Dicloro-2-(3-isopropil-3-poliestirilmetil-1-triazen-1-il)benzonitrilo (R18)



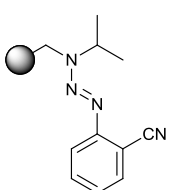
Siguiendo la metodología general, 514.5 mg (1.8 mmol) de 2-amino-3,5-diclorobenzonitrilo y 856.0 mg (0.6 mmol) de resina **R3** se convierten en 915.5 g de resina **R18**. IR (cm^{-1}): $\nu = 3024$ (ps), 2915 (ps), 2230 (CN), 1600 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1393 (N=N), 1229, 1173, 1066 (C-Cl), 1027, 754, 695, 538. **Análisis elemental** ($\text{C}_{298}\text{H}_{298}\text{Cl}_2\text{N}_4$): Calculado %C 89.33, %H 7.50, %N 1.40. Hallado: %C 85.64, %H 7.68, %N 1.25. Carga: 0.3320 mmol/g.

3,5-Dibromo-2-(3-isopropil-3-poliestirilmetil-1-triazen-1-il)benzonitrilo (R19)



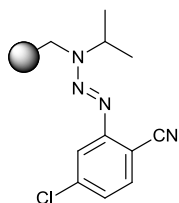
Siguiendo la metodología general, 562.1 mg (1.5 mmol) de 2-amino-3,5-dibromobenzonitrilo y 725.0 mg (0.5 mmol) de resina **R3** se convierten en 795.0 mg de resina **R19**. IR (cm^{-1}): $\nu = 3024$ (ps), 2917 (ps), 2233 (CN), 1600 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1390 (N=N), 1227, 1027, 906, 754, 695, 533. **Análisis elemental** ($\text{C}_{297}\text{H}_{297}\text{Br}_2\text{N}_4$): %C 87.38, %H 7.33, %N 1.37. Hallado: %C 82.51, %H 7.33, %N 0.98. Carga: 0.3069 mmol/g.

2-(3-Isopropil-3-poliestirilmetil-1-triazen-1-il)benzonitrilo (R20)



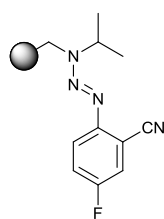
Siguiendo la metodología general, 2.0 g (9.0 mmol) de 2-aminobenzonitrilo y 4.00 g (3.0 mmol) de resina **R3** se convierten en 4.23 g de resina **R20**. IR (cm^{-1}): $\nu = 3433$ (ps), 3024 (ps), 2919 (ps), 2240 (CN), 1610 (ps), 1492 (ps), 1360 (N=N), 1261, 1165, 1065, 1027, 817, 751, 695, 530, 458. **Análisis elemental** ($\text{C}_{176}\text{H}_{178}\text{N}_4$): Calculado %C 89.98, %H 7.64, %N 2.38. Hallado: %C 85.60, %H 7.30, %N 2.08. Carga: 0.4216 mmol/g.

4-Cloro-2-(3-isopropil-3-poliestirilmetil-1-triazen-1-il)benzonitrilo (R21)



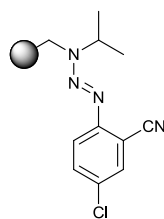
Siguiendo la metodología general, 2.30 g (9.0 mmol) de 2-amino-4-clorobenzonitrilo y 4.00 g (3.0 mmol) de resina **R3** se convierten en 4.30 g de resina **R21**. IR (cm⁻¹): ν = 3023 (ps), 2917 (ps), 2235 (CN), 1583 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1387 (N=N), 1231, 1172, 1065 (C-Cl), 1027, 904, 814, 752, 695, 535, 420. **Análisis elemental** (C₁₇₆H₁₇₆ClN₄): Calculado %C 88.68, %H 7.48, %N 2.35. Hallado: %C 84.52, %H 7.17, %N 2.27. Carga: 0.4265 mmol/g.

5-Fluoro-2-(3-isopropil-3-poliestirilmetil-1-triazen-1-il)benzonitrilo (R22)



Siguiendo la metodología general, 1.10 g (4.5 mmol) de 2-amino-5-fluorobenzonitrilo y 2.02 g (1.5 mmol) de resina **R3** se convierten en 2.14 g de resina **R22**. IR (cm⁻¹): ν = 3023 (ps), 2914 (ps), 2230 (CN), 1600 (ps), 1491(ps), 1449 (ps), 1390 (N=N), 1257 (C-F), 1169, 1062, 1027, 904, 827, 753, 695, 535. **Análisis elemental** (C₁₈₀H₁₈₁FN₄): Calculado %C 89.36, %H 7.54, %N 2.32. Hallado: %C 85.42, %H 7.33, %N 2.10. Carga: 0.3941 mmol/g.

5-Cloro-2-(3-isopropil-3-poliestirilmetil-1-triazen-1-il)benzonitrilo (R23)

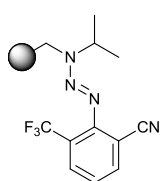


Siguiendo la metodología general, 527.9 mg (2.1 mmol) de 2-amino-5-clorobenzonitrilo y 900.0 mg (0.7 mmol) de resina **R3** se convierten en 965.0 mg de resina **R23**. IR (cm⁻¹): ν = 3024 (ps), 2919(ps), 1580 (ps), 1492 (ps), 1452 (ps), 1368 (N=N), 1220, 1168, 1065 (C-Cl), 1027, 910, 817, 751, 695, 530, 420. **Análisis elemental** (C₁₈₁H₁₈₂ClN₄): Calculado: %C 88.77, %H 7.49, %N 2.29. Hallado: %C 85.48, %H 7.20, %N 1.80. Carga: 0.4113 mmol/g.

Procedimiento general para la reducción del grupo nitrilo (R6, R24-R30)

Se prepara una suspensión de la resina **R5**, **R17-R23** (1 equiv) en THF anhidro y se enfría hasta 0 °C. Se añade una disolución de hidruro de litio y aluminio en THF (2 equiv), y la mezcla resultante se agita durante 12 horas a 70 °C. Tras este tiempo, se lava la resina con una disolución de tartrato de sodio y potasio y después siguiendo el procedimiento secuencial de lavado: metanol x 3, acetona x 3 y diclorometano x 3. Finalmente, se seca a vacío.

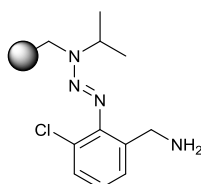
3-(Trifluorometil)-2-(3-isopropil-3-poliestirilmetil-1-triazen-1-il)bencilamina (R6)



Siguiendo la metodología general, 4.99 g (2.2 mmol) de resina **R5** se convierten en 5.01 g de resina **R6**. IR (cm⁻¹): ν = 3427 (NH₂), 3058 (NH₂), 3023 (ps), 2919 (ps), 2848 (ps), 1645 (NH₂), 1600 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1374 (N=N), 1153, 1116, 1075, 1027, 979, 904, 749, 695, 589, 532.

Análisis elemental (C₁₉₃H₁₉₇F₃N₄): Calculado %C 88.15, %H 7.55, %N 2.13. Hallado: %C 76.67, %H 6.89, %N 1.96. Carga: 0.4357 mmol/g.

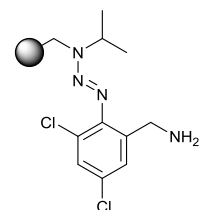
3-Cloro-2-(3-isopropil-3-poliestirilmetil-1-triazen-1-il)bencilamina (R24)



Siguiendo la metodología general, 800.0 mg (0.2 mmol) de resina **R17** se convierten en 803.4 g de resina **R24**. IR (cm⁻¹): ν = 3423 (NH₂), 3024 (ps), 2921 (ps), 1652 (NH₂), 1600 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1363 (N=N), 1170, 1066 (C-Cl), 1026, 905, 747, 695, 532. **Análisis elemental**

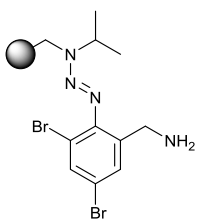
(C₂₄₁H₂₄₆ClN₄): Calculado %C 89.34, %H 7.73, %N 1.65. Hallado: %C 77.16, %H 7.19, %N 1.26. Carga: 0.3008 mmol/g.

3,5-Dicloro-2-(3-isopropil-3-poliestirilmetil-1-triazen-1-il)bencilamina (R25)



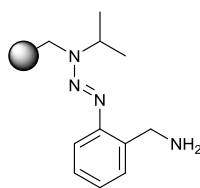
Siguiendo la metodología general, 800.0 mg (0.3 mmol) de resina **R18** se convierten en 803.7 mg de resina **R25**. IR (cm⁻¹): ν = 3406 (NH₂), 3023 (ps), 2918 (ps), 1598 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1366 (N=N), 1125, 1067, 1026, 746, 695, 532. **Análisis elemental** (C₃₄₄H₃₄₅Cl₂N₄): Calculado %C 89.70, %H 7.55, %N 1.22. Hallado: %C 75.25, %H 7.25, %N 0.84. Carga: 0.3305 mmol/g.

3,5-Dibromo-2-(3-isopropil-3-poliestirilmetil-1-triazen-1-il)bencilamina (R26)



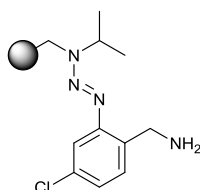
Siguiendo la metodología general, 700.0 mg (0.2 mmol) de resina **R19** se convierten en 702.6 g de resina **R26**. IR (cm⁻¹): ν = 3441 (NH₂), 3024 (ps), 2918 (ps), 1600 (ps), 1492 (ps), 1451 (ps), 1367 (N=N), 1167, 1068, 1027, 904, 747, 695, 533. **Análisis elemental** (C₄₀₅H₄₀₅Br₂N₄): Calculado %C 88.66, %H 7.51, %N 0.99. Hallado: %C 75.23, %H 7.25, %N 0.76. Carga: 0.3057 mmol/g.

2-(3-isopropil-3-poliestirilmetil-1-triazen-1-il)bencilamina (R27)



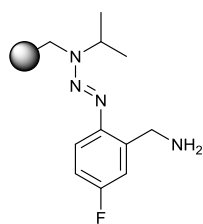
Siguiendo la metodología general, 4.20 g (1.8 mmol) de resina **R20** se convierten en 4.22 g de resina **R27**. IR (cm⁻¹): ν = 3433 (NH₂), 3025 (ps), 2919 (ps), 1610 (ps), 1490 (ps), 1363 (N=N), 1261, 1165, 1065, 1027, 817, 751, 695, 540, 450. **Análisis elemental** (C₂₁₇H₂₂₃N₄): Calculado %C 90.27, %H 7.79, %N 1.94. Hallado: %C 87.40, %H 7.22, %N 1.78. Carga: 0.4198 mmol/g.

4-Cloro-2-(3-isopropil-3-poliestirilmetil-1-triazen-1-il)bencilamina (R28)



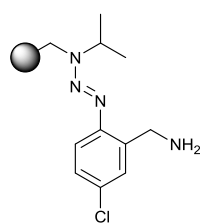
Siguiendo la metodología general, 4.10 g (1.7 mmol) de resina **R21** se convierten en 4.12 g de resina **R28**. IR (cm⁻¹): ν = 3384 (NH₂), 3024 (ps), 2920 (ps), 1590 (ps), 1492 (ps), 1367 (N=N), 1112, 1065, 994, 919, 746, 694, 666, 530. **Análisis elemental** (C₂₁₉H₂₂₄ClN₄): Calculado %C 89.24, %H 7.66, %N 1.90. Hallado: %C 86.81, %H 7.18, %N 1.59. Carga: 0.4242 mmol/g.

5-Fluoro-2-(3-isopropil-3-poliestirilmetil-1-triazen-1-il)bencilamina (R29)



Siguiendo la metodología general, 1.90 g (0.7 mmol) de resina **R22** se convierten en 1.91 g de resina **R29**. IR (cm⁻¹): ν = 3433 (NH₂), 3024 (ps), 2919 (ps), 1600 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1363 (N=N), 1261, 1165, 1065, 1027, 817, 751, 695, 530, 456. **Análisis elemental** (C₂₉₁H₂₉₆FN₄): Calculado %C 90.35, %H 7.71, %N 1.45. Hallado: %C 87.30, %H 7.30, %N 1.17. Carga: 0.3921 mmol/g.

5-Cloro-2-(3-isopropil-3-poliestirilmetil-1-triazen-1-il)bencilamina (R30)



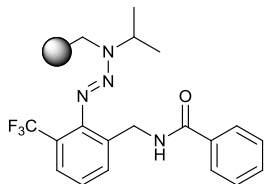
Siguiendo la metodología general, 890.0 mg (0.4 mmol) de resina **R23** se convierten en 895.0 mg de resina **R30**. IR (cm⁻¹): ν = 3386 (NH₂), 3024 (ps), 2920 (ps), 1580 (ps), 1492 (ps), 1376 (N=N), 1115, 1065, 994, 920, 750, 695, 665, 530. **Análisis elemental** (C₂₆₄H₂₆₉ClN₄): Calculado %C 89.74, %H 7.67, %N 1.59. Hallado: %C 80.03, %H 7.44, %N 0.92. Carga: 0.4091 mmol/g.

Procedimiento general para el acoplamiento de cloruros de ácido (R7-R15, R31-R37)

Se prepara una suspensión de la resina correspondiente (1 equiv) junto con la trietilamina (3 equiv) en THF anhidro. A continuación, se añade el correspondiente cloruro de ácido (2.5 equiv) y la mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Tras este tiempo, se lava la resina siguiendo el siguiente procedimiento secuencial

de lavado: agua x 3, THF x 3, metanol x 3, acetona x 3 y diclorometano x 3, y se seca a vacío.

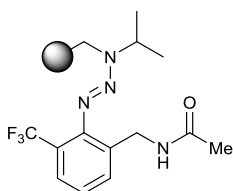
***N*-[3-(Trifluorometil)-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]benzamida (R7)**



Siguiendo la metodología general, 105.5 mg (0.8 mmol) de cloruro de benzoilo, 0.125 mL (0.9 mmol) de Et₃N y 720.0 mg (0.3 mmol) de resina **R6** se convierten en 723.0 mg de resina **R37**. IR (cm⁻¹): ν = 3433 (NH), 3024 (ps), 2921 (ps), 1636 (CO), 1600 (ps), 1508 (NH), 1491 (ps), 1449 (ps), 1316 (N=N), 1126, 1026, 753, 695, 528.

Análisis elemental (C₁₇₁H₁₇₂F₃N₄O): Calculado %C 87.17, %H 7.36, %N 2.38. Hallado: %C 84.33, %H 6.80, %N 2.12. Carga: 0.3061 mmol/g.

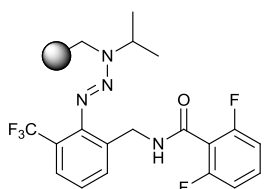
***N*-[3-(Trifluorometil)-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]acetamida (R8)**



Siguiendo la metodología general, 78.5 mg (1.0 mmol) de cloruro de acetilo, 0.167 mL (1.2 mmol) de Et₃N y 1.00 g (0.4 mmol) de resina **R6** se convierten en 1.02 g de resina **R8**. IR (cm⁻¹): ν = 3424 (NH), 3024 (ps), 2920 (ps), 1647 (CO), 1600 (ps), 1492 (ps), 1450 (NH), 1367 (N=N), 1317, 1126, 1026, 905, 753, 695, 532, 403. **Análisis elemental**

(C₂₂₉H₂₃₃F₃N₄O): Calculado %C 88.32, %H 7.54, %N 1.80. Hallado: %C 78.80, %H 7.06, %N 1.40. Carga: 0.3393 mmol/g.

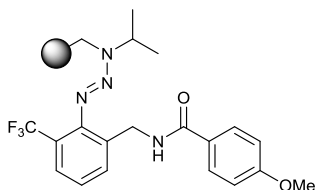
***N*-[3-(Trifluorometil)-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]-2,6-difluorobenzamida (R9)**



Siguiendo la metodología general, 176.5 mg (1.0 mmol) de cloruro de 2,6-difluorobenzoilo, 0.167 mL (1.2 mmol) de Et₃N y 900.0 mg (0.4 mmol) de resina **R6** se convierten en 940.5 mg de resina **R9**. IR (cm⁻¹): ν = 3424 (NH), 3024 (ps), 2920 (ps), 1624 (CO), 1600 (ps), 1492 (ps), 1466 (NH), 1451 (ps), 1317 (N=N), 1233, 1126, 1026,

1003, 906, 754, 695, 530. **Análisis elemental** (C₂₁₄H₂₁₃F₅N₄O): Calculado %C 87.07, %H 7.27, %N 1.90. Hallado: %C 73.88, %H 6.62, %N 1.23. Carga: 0.3044 mmol/g.

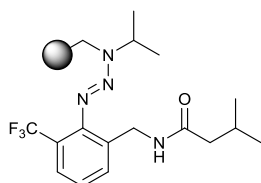
***N*-[3-(Trifluorometil)-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]-4-metoxibenzamida (R10)**



Siguiendo la metodología general, 170.6 mg (1.0 mmol) de cloruro de 4-metoxibenzoilo, 0.167 mL (1.2 mmol) de Et₃N y 1.00 g (0.4 mmol) de resina **R6** se convierten en 1.04 g de resina **R10**. IR (cm⁻¹): ν = 3409 (NH), 3024 (ps), 2918 (ps), 1650 (CO), 1602 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1316 (N=N), 1251, 1126, 1027,

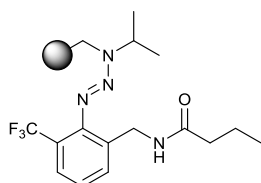
839, 753, 695, 532, 405. **Análisis elemental** ($C_{206}H_{206}F_3N_4O$): Calculado %C 87.46, %H 7.41, %N 1.98. Hallado: %C 74.35, %H 6.84, %N 1.20. Carga: 0.3130 mmol/g.

***N*-[3-(Trifluorometil)-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]-3-metilbutiramida (R11)**



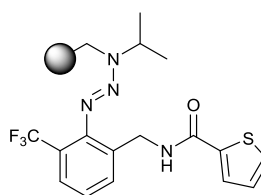
Siguiendo la metodología general, 120.6 mg (1.0 mmol) de cloruro de isobutirilo, 0.167 mL (1.2 mmol) de Et_3N y 900.0 mg (0.4 mmol) de resina **R6** se convierten en 924.5 mg de resina **R11**. IR (cm^{-1}): ν = 3448 (NH), 3024 (ps), 2921 (ps), 1643 (CO), 1600 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1366 (N=N), 1316 (N=N), 1126, 1027, 905, 753, 695, 531. **Análisis elemental** ($C_{208}H_{215}F_3N_4O$): Calculado %C 87.84, %H 7.62, %N 1.97. Hallado: %C 79.53, %H 7.18, %N 1.25. Carga: 0.3096 mmol/g.

***N*-[3-(Trifluorometil)-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]-3-butiramida (R12)**



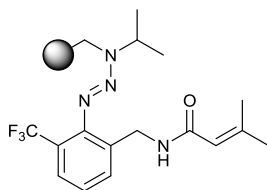
Siguiendo la metodología general, 53.3 mg (0.5 mmol) de cloruro de butirilo, 0.084 mL (0.6 mmol) de Et_3N y 500.0 mg (0.2 mmol) de resina **R6** se convierten en 512.0 mg de resina **R12**. IR (cm^{-1}): ν = 3446 (NH), 3024 (ps), 2921 (ps), 1645(CO), 1600 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1316 (N=N), 1127, 1026, 905, 754, 695, 532. **Análisis elemental** ($C_{205}H_{211}F_3N_4O$): Calculado %C 87.81, H 7.59, N 2.00. Hallado: %C 79.82, H 7.22, N 1.18. Carga: 0.3277 mmol/g.

***N*-[3-(Trifluorometil)-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]-2-tienilcarboxamida (R13)**



Siguiendo la metodología general, 73.3 mg (0.5 mmol) de cloruro de 2-tienilcarbonilo, 0.084 mL (0.6 mmol) de Et_3N y 500.0 mg (0.2 mmol) de resina **R6** se convierten en 517.0 mg de resina **R13**. IR (cm^{-1}): ν = 3420 (NH), 3024 (ps), 2921 (ps), 1648 (CO), 1600 (ps), 1488 (ps), 1450 (ps), 1368, 1320 (N=N), 1127, 1026, 908, 754, 695, 532. **Análisis elemental** ($C_{209}H_{210}F_3N_4OS$): Calculado %C 87.07, %H 7.34, %N 1.94, %S 1.11. Hallado: %C 83.80, %H 6.87, %N 1.75, %S 1.02. Carga: 0.2950 mmol/g.

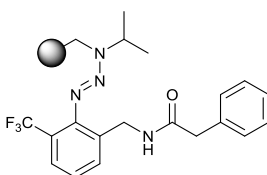
***N*-[3-Trifluorometil-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]-3-metil-2-butenamida (R14)**



Siguiendo la metodología general, 118.6 mg (1.0 mmol) de cloruro de 3-metil-2-butenilo, 0.167 mL (1.2 mmol) de Et₃N y 880.0 mg (0.4 mmol) de resina **R6** se convierten en 902.0 mg de resina **R14**.

IR (cm⁻¹): ν = 3425 (NH), 3024 (ps), 2920 (ps), 1646 (CO), 1600 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1366 (N=N), 1316, 1126, 1027, 904, 753, 695, 533. **Análisis elemental** (C₂₀₉H₂₁₄F₃N₄O): Calculado %C 87.93, %H 7.56, %N 1.96. Hallado: %C 74.42, %H 7.11, %N 1.54. Carga: 0.2976 mmol/g.

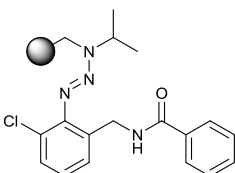
***N*-[3-(Trifluorometil)-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]bencilamida (R15)**



Siguiendo la metodología general, 116.0 mg (0.8 mmol) de cloruro de 2-fenilacetilo, 0.125 mL (0.9 mmol) de Et₃N y 600.0 mg (0.3 mmol) de resina **R6** se convierten en 622.0 mg de resina **R15**.

IR (cm⁻¹): ν = 3459 (NH), 3059 (NH), 3024 (ps), 2920 (ps), 1648 (CO), 1600 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1316 (N=N), 1126, 1028, 905, 754, 695, 533, 430. **Análisis elemental** (C₂₁₀H₂₁₂F₃N₄O): Calculado %C 88.04, %H 7.46, %N 1.96. Hallado: %C 75.49, %H 6.85, %N 1.53. Carga: 0.2968 mmol/g.

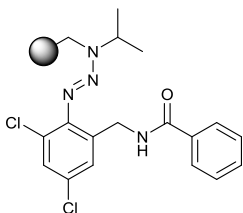
***N*-[3-Cloro-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]benzamida (R31)**



Siguiendo la metodología general, 70.3 mg (0.5 mmol) de cloruro de benzoilo, 0.084 mL (0.6 mmol) de Et₃N y 700.0 mg (0.2 mmol) de resina **R24** se convierten en 716.0 mg de resina **R31**.

IR (cm⁻¹): ν = 3433 (NH), 3058 (NH), 3024 (ps), 2920 (ps), 1651 (CO), 1600 (ps), 1512 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1366 (N=N), 1269, 1175, 1067, 1026, 962, 905, 752, 695, 527, 404. **Análisis elemental** (C₃₀₅H₃₀₇ClN₄O): Calculado %C 89.78, %H 7.58, %N 1.37. Hallado: %C 80.09, %H 6.89, %N 1.25. Carga: 0.2118 mmol/g.

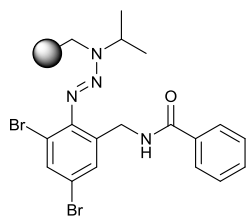
***N*-[3,5-Dicloro-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]benzamida (R32)**



Siguiendo la metodología general, 70.3 mg (0.5 mmol) de cloruro de benzoilo, 0.084 mL (0.6 mmol) de Et₃N y 725.0 mg (0.2 mmol) de resina **R25** se convierten en 742.0 mg de resina **R32**.

IR (cm⁻¹): ν = 3417 (NH), 3024 (ps), 2917 (ps), 1634 (CO), 1600 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1269 (N=N), 1175, 1067, 1026, 750, 695, 532, 400. **Análisis elemental** (C₃₇₉H₃₈₀Cl₂N₄O): Calculado %C 89.64, %H 7.54, %N 1.10. Hallado: %C 77.60, %H 6.75, %N 0.91. Carga: 0.2227 mmol/g.

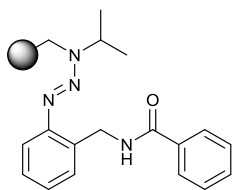
***N*-[3,5-Dibromo-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]benzamida (R33)**



Siguiendo la metodología general, 70.3 mg (0.5 mmol) de cloruro de benzoilo, 0.084 mL (0.6 mmol) de Et₃N y 540.0 mg (0.2 mmol) de resina **R26** se convierten en 556.0 mg de resina **R33**. IR (cm⁻¹): ν = 3417 (NH), 3023 (ps), 2920 (ps), 1636 (CO), 1600 (ps), 1491 (ps), 1450 (ps), 1269 (N=N), 1175, 1067, 1026, 905, 750, 695, 533.

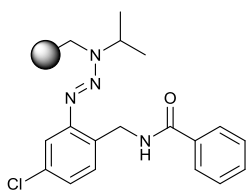
Análisis elemental (C₄₃₉H₄₄₀Br₂N₄O): Calculado %C 88.65, %H 7.46, %N 0.94. Hallado: %C 76.51, %H 7.01, %N 0.74. Carga: 0.2790 mmol/g.

***N*-[2-(3-Isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]benzamida (R34)**



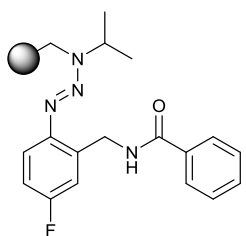
Siguiendo la metodología general, 281.2 mg (2.0 mmol) de cloruro de benzoilo, 0.335 mL (2.4 mmol) de Et₃N y 2.00 g (0.8 mmol) de resina **R27** se convierten en 2.07 g de resina **R34**. IR (cm⁻¹): ν = 3438 (NH), 3024 (ps), 2921 (ps), 1640 (CO), 1600 (ps), 1508 (ps), 1488 (ps), 1449, 1320 (N=N), 1128, 1050, 753, 695, 528. **Análisis elemental** (C₂₃₀H₂₃₃N₄O): Calculado %C 90.00, %H 7.65, %N 1.83. Hallado: %C 87.77, %H 7.32, %N 1.29. Carga: 0.3049 mmol/g.

***N*-[4-Cloro-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]benzamida (R35)**



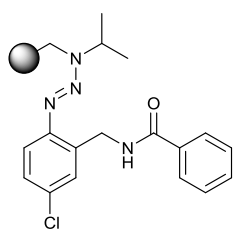
Siguiendo la metodología general, 140.6 mg (1.0 mmol) de cloruro de benzoilo, 0.167 mL (1.2 mmol) de Et₃N y 1.00 g (0.4 mmol) de resina **R28** se convierten en 1.06 g de resina **R35**. IR (cm⁻¹): ν = 3377 (NH), 3024 (ps), 2917 (ps), 1666 (CO), 1600 (ps), 1512 (NH), 1491 (ps), 1450, 1388 (N=N), 1270, 1171, 1068, 1027, 905, 752, 695, 534, 403. **Análisis elemental** (C₂₃₆H₂₃₈ClN₄O): Calculado %C 89.08, %H 7.54, %N 1.76. Hallado: %C 79.75, %H 6.92, %N 1.59. Carga: 0.2799 mmol/g.

***N*-[5-Fluoro-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]benzamida (R36)**



Siguiendo la metodología general, 140.6 mg (1.0 mmol) de cloruro de benzoilo, 0.167 mL (1.2 mmol) de Et₃N y 950.0 mg (0.4 mmol) de resina **R29** se convierten en 978.0 mg de resina **R36**. IR (cm⁻¹): ν = 3433 (NH), 3023 (ps), 2921 (ps), 1663 (CO), 1600 (ps), 1509, 1491 (ps), 1450 (ps), 1365 (N=N), 1268, 1166 (C-F), 1066, 1026, 952, 820, 750, 695, 530. **Análisis elemental** (C₃₀₈H₃₁₀FN₄O): Calculado %C 90.17, %H 7.62, %N 1.37. Hallado: %C 87.18, %H 7.12, %N 1.11. Carga: 0.2780 mmol/g.

***N*-[5-Cloro-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]benzamida (R37)**

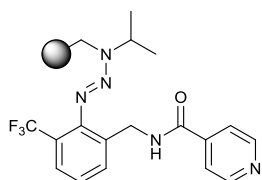


Siguiendo la metodología general, 105.5 mg (0.8 mmol) de cloruro de benzoilo, 0.125 mL (0.9 mmol) de Et₃N y 850.0 mg (0.3 mmol) de resina **R30** se convierten en 876.0 mg de resina **R37**. IR (cm⁻¹): ν = 3374 (NH), 3025 (ps), 2912 (ps), 1660 (CO), 1600 (ps), 1510 (ps), 1491 (ps), 1448 (ps), 1388 (N=N), 1258, 1170, 1068 (C-Cl), 1027 (C-Cl), 905, 752, 695, 530, 420 (C-Cl). **Análisis elemental** (C₂₈₆H₂₈₈ClN₄O): Calculado %C 89.62, %H 7.57, %N 1.46. Hallado: %C 79.77, %H 7.32, %N 1.09. Carga: 0.2818 mmol/g.

Procedimiento general para el acoplamiento de ácidos carboxílicos (R16, R38).

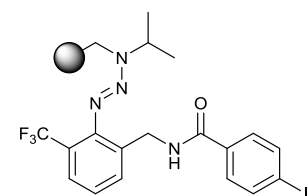
Se prepara una disolución del correspondiente ácido carboxílico (3 equiv), DCC (3 equiv) y DMAP (1.5 equiv) y se agita a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se añade esta disolución sobre una suspensión de la resina correspondiente (1 equiv) en cloroformo, y la mezcla resultante se agita durante toda la noche a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se lava la resina siguiendo el siguiente procedimiento secuencial de lavado: agua x 3, THF x 3, metanol x 3, acetona x 3 y diclorometano x 3, y se seca a vacío.

***N*-[3-(Trifluorometil)-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]isonicotinamida (R16)**



Siguiendo la metodología general, 110.8 mg (0.9 mmol) de ácido isonicotínico, 185.7 mg (0.9 mmol) de DCC, 55.0 mg (0.5 mmol) de DMAP y 800.0 mg (0.3 mmol) de resina **R6** se convierten en 833.5 mg de resina **R16**. IR (cm⁻¹): ν = 3401 (NH), 3058 (NH), 3024 (ps), 2919 (ps), 1638 (CO), 1600 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1316 (N=N), 1222, 1126, 1025, 906, 753, 695, 530. **Análisis elemental** (C₂₀₆H₂₀₇F₃N₅O): Calculado %C 87.56, %H 7.38, %N 2.48. Hallado: %C 79.53, %H 7.18, %N 1.25. Carga: 0.3346 mmol/g.

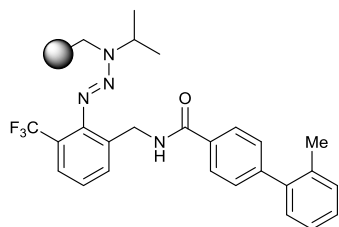
***N*-[3-(Trifluorometil)-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)bencil]-4-iodobenzamida (R38)**



Siguiendo la metodología general, 248.0 mg (1.0 mmol) de ácido 4-iodobenzoico, 247.6 mg (1.2 mmol) de DCC, 73.3 mg (0.6 mmol) de DMAP y 1.0 g (0.4 mmol) de resina **R6** se convierten en 1.1 g de resina **R38**. IR (cm⁻¹): ν = 3425 (NH), 3024 (ps), 2921 (ps), 2848 (ps), 1648 (CO), 1583 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1389 (N=N), 1316 (N=N), 1269, 1127, 1084, 1027, 1006, 838, 748, 695 (C-I), 533 (C-I). **Análisis elemental**

(C₂₀₆H₂₀₆F₃IN₄O): Calculado %C 84.22, %H 7.07, %N 1.91. Hallado: %C 68.35, %H 6.17, %N 1.47. Carga: 0.3262 mmol/g.

Síntesis de *N*-[3-(Trifluorometil)-2-(3-isopropil-3-poliestiril-1-triazen-1-il)]-(2'-metil-4,1'-bifenil)-1-carboxamida (**R39**)



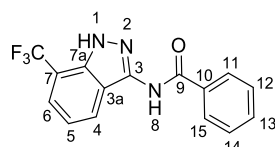
Sobre una suspensión de 900.0 mg de la resina **R38** (0.3 mmol, 1 equiv) en DMF bajo atmósfera de nitrógeno, se añaden 34.7 mg de Pd(PPh₃)₄ (0.03 mmol, 0.1 equiv). Tras 5 minutos de agitación, se añaden 81.6 mg del ácido 2-metilborónico (0.6 mmol, 2 equiv) y 0.4 mL de una disolución de Na₂CO₃ 2M (0.8 mmol, 2.5 equiv). La mezcla resultante se agita a 85 °C durante 12 horas. A continuación, la mezcla se enfría a temperatura ambiente, se añade una disolución NH₄OAc al 25%, y se agita durante 5 minutos más antes de filtrarse. Tras este tiempo, la resina se lava siguiendo el siguiente procedimiento secuencial de lavado: agua x 3, THF x 3, metanol x 3, acetona x 3 y diclorometano x 3, y se seca a vacío, obteniéndose 921.0 mg de la resina **R39**. IR (cm⁻¹): ν = 3442 (NH), 3024 (ps), 2921 (ps), 1664 (CO), 1600 (ps), 1492 (ps), 1450 (ps), 1316 (N=N), 1271, 1126, 1026, 854, 750 (CF₃), 695 (CF₃), 533. **Análisis elemental** (C₂₀₆H₂₀₆F₃N₄O): Calculado %C 88.02, %H 7.39, %N 1.99. Hallado: %C 80.53, %H 7.18, %N 1.25. Carga: 0.2256 mmol/g.

1.10.3. Obtención de los productos de desanclaje de las resinas de triazeno

Procedimiento general

Se prepara una suspensión de la resina correspondiente (**R7-R16**, **R31-R37**, **R39**) (1 equiv) en diclorometano anhidro bajo atmósfera de nitrógeno. Sobre esta suspensión se añade ácido trifluoroacético (2.1 equiv) y la mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante toda 12 horas. A continuación, se elimina el disolvente a presión reducida y el filtrado obtenido se purifica tal y como se indica en cada caso para obtener el producto deseado.

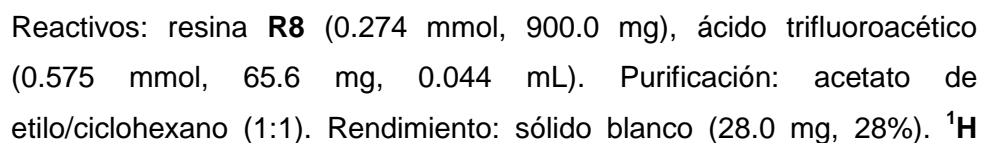
N-[7-(Trifluorometil)-1*H*-indazol-3-il]benzamida (**110**)



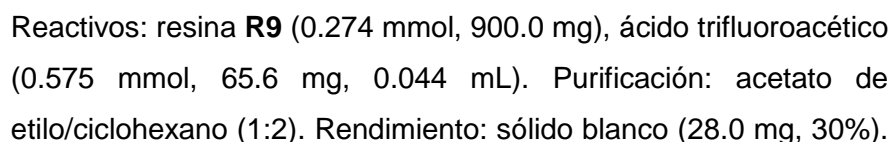
Reactivos: resina **R7** (0.214 mmol, 700.0 mg), ácido trifluoroacético (0.450 mmol, 51.3 mg, 0.034 mL). Purificación: acetato de etilo/ciclohexano (1:2). Rendimiento: sólido blanco (20.0 mg, 31%).

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.40 (s, 1H, NH), 11.00 (s, 1H, NH), 8.10 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-12, H-14), 8.07 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-6), 7.79 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-4), 7.65 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-5), 7.57 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-11, H-15), 7.28 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-13). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.8 (C-9), 141.1 (C-3), 135.6 (q, *J*

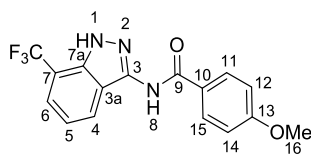
1-[8-(Trifluorometil)benzo[d][1,2,3]triazin-3(4*H*)-il]metilcetona (111)



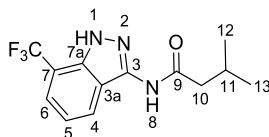
***N*-[7-(Trifluorometil)-1*H*-indazol-3-il]-2,6-difluorobenzamida (112)**



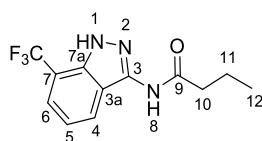
210

***N*-[7-(Trifluorometil)-1*H*-indazol-3-il]-4-metoxibenzamida (113)**

Reactivos: resina **R10** (0.313 mmol, 1.0 g), ácido trifluoroacético (0.657 mmol, 74.9 mg, 0.050 mL). Aislamiento: recristalización en dietiléter. Rendimiento: sólido blanco (31.0 mg, 30%). **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.36 (s, 1 H, H-8), 10.84 (s, 1 H, H-1), 8.09 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H, H-11, H-15), 8.04 (d, *J* = 7.3 Hz, 1 H, H-4), 7.78 (d, *J* = 7.3 Hz, 1 H, H-6), 7.26 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 H, H-5), 7.09 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H, H-12, H-14), 3.87 (s, 3H, H-16). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.2 (C-9), 162.2 (C-13), 141.4 (C-3), 135.6 (m, C-7a), 129.9 (C-11, C-15), 127.2 (C-5), 124.3 (q, *J* = 4.8 Hz, C-6), 124.0 (q, *J* = 280.0 Hz, CF₃), 119.1 (C-4), 118.9 (C-3a), 113.7 (C-12, C-14), 111.4 (q, *J* = 33.4 Hz, C-7), 55.4 (C-16). **EM** (EI) (*m/z*): 335 (40) [M]⁺, 169 (15), 135 (100), 69 (25). **HRMS** (C₁₆H₁₂F₃N₃O₂) [M]: calculado: 335.0882, hallado: 335.0881. **IR** (ATR, ν): 3402.1 (NH), 1738.3, 1709.8, 1672.7 (CO), 1625.2, 1604.0, 1556.0, 1512.2, 1458.9 (NH), 1374.7, 1350.6, 1316.9, 1263.5, 1210.9, 1145.3, 1112.0, 1072.4, 1032.1, 940.6, 853.1, 796.4, 758.3, 745.4, 727.1, 628.7, 600.2, 520.0 cm⁻¹.

***N*-[7-(Trifluorometil)-1*H*-indazol-3-il]-3-metilbutiramida (114)**

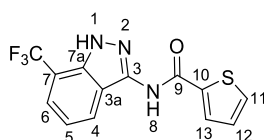
Reactivos: resina **R11** (0.279 mmol, 900.0 mg), ácido trifluoroacético (0.585 mmol, 66.7 mg, 0.045 mL). Purificación: acetato de etilo/ciclohexano (1:1). Rendimiento: sólido blanco (24.0 mg, 30%). **¹H RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12.15 (s, 1 H, H-8), 10.52 (s, 1 H, H-1), 8.08 (d, *J* = 7.3 Hz, 1 H, H-4), 7.74 (d, *J* = 7.3 Hz, 1 H, H-6), 7.24 (t, *J* = 7.3 Hz, 1 H, H-5), 2.31 (d, *J* = 7.1 Hz, 2 H, H-10), 2.17-2.12 (m, 1 H, H-11), 0.99 (d, *J* = 6.6 Hz, 6 H, H-12, H-13). **¹³C RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171.0 (C-9), 141.1 (C-3), 135.4 (q, *J* = 5.2 Hz, C-7a), 127.4 (C-5), 124.3 (q, *J* = 4.2 Hz, C-6), 124.0 (q, *J* = 271.3 Hz, CF₃), 118.9 (C-4), 118.2 (C-3a), 111.3 (q, *J* = 33.3 Hz, C-7), 44.4 (C-10), 25.6 (C-11), 22.3 (C-12, C-13). **EM** (EI) (*m/z*): 285 (20) [M]⁺, 201 (100), 181 (15), 57 (15). **HRMS** (C₁₃H₁₄F₃N₃O) [M]: calculado: 285.1089, hallado: 285.1089. **IR** (ATR, ν): 3269.1 (NH), 2960.1, 1664.0 (CO), 1603.5, 1551.4, 1508.7, 1452.1 (NH), 1422.2, 1370.0, 1320.3, 1269.1, 1218.7, 1117.6, 1083.7, 1049.2, 978.6, 927.1, 861.8, 798.4, 727.8, 687.8, 599.3, 578.0, 556.3 cm⁻¹.

***N*-[7-(Trifluorometil)-1*H*-indazol-3-il]butiramida (115)**

Reactivos: resina **R12** (0.164 mmol, 500.0 mg), ácido trifluoroacético (0.344 mmol, 34.2 mg, 0.026 mL). Purificación: recristalización en dietiléter. Rendimiento: sólido blanco (15.0 mg, 34%). **¹H RMN** (400 MHz, Acetona-*d*₆): δ 12.16 (s, 1 H, H-8), 9.51 (s, 1 H, H-1), 8.17 (d, *J*

= 7.3 Hz, 1 H, H-4), 7.60 (d, $J = 7.3$ Hz, 1 H, H-6), 7.12 (t, $J = 7.3$ Hz, 1 H, H-5), 2.38 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H, H-10), 1.64 (sext, $J = 7.2$ Hz, 2 H, H-11), 0.88 (t, $J = 7.4$ Hz, 3 H, H-12). **¹³C RMN** (100 MHz, Acetona- d_6): δ 172.0 (C-9), 142.8 (C-3), 137.1 (m, C-7a), 129.3 (C-5), 125.3 (q, $J = 4.8$ Hz, C-6), 125.2 (q, $J = 270.4$ Hz, CF_3), 119.7 (C-4), 119.2 (C-3a), 112.9 (q, $J = 34.5$ Hz, C-7), 38.5 (C-10), 19.6 (C-11), 14.0 (C-12). **EM** (EI) (m/z): 271 (20) $[M]^+$, 201 (100), 181 (15), 69 (12). **HRMS** ($C_{12}H_{12}F_3N_3O$) $[M]$: calculado: 271.0927; hallado: 271.0927. **IR** (ATR, ν): 3267.4 (NH), 2959.8, 1661.5 (CO), 1603.3, 1550.8, 1508.5, 1451.8 (NH), 1421.6, 1369.7, 1309.4, 1230.8, 1116.6, 1084.1, 1049.4, 978.3, 926.3, 861.5, 799.2, 727.4, 686.7, 596.5, 577.7, 542.3 cm^{-1} .

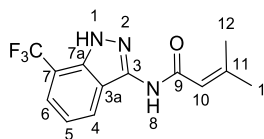
***N*-[7-(Trifluorometil)-1*H*-indazol-3-il]-2-tienilcarboxamida (116)**



Reactivos: resina **R13** (0.148 mmol, 500.0 mg), ácido trifluoroacético (0.310 mmol, 35.3 mg, 0.024 mL). Purificación: acetato de etilo/ciclohexano (1:2). Rendimiento: sólido blanco (14.0 mg, 30%). **¹H RMN** (400 MHz, Acetona- d_6): δ 8.17 (d, $J = 7.2$ Hz, 1

H, H-4), 8.01 (dd, $J = 3.8, 1.1$ Hz, 1 H, H-14), 7.71 (dd, $J = 5.0, 1.1$ Hz, 1 H, H-12), 7.64 (d, $J = 7.2$ Hz, 1 H, H-6), 7.18 (t, $J = 7.2$ Hz, 1 H, H-5), 7.12 (dd, $J = 5.0, 3.8$ Hz, 1 H, H-13). **¹³C RMN** (100 MHz, Acetona- d_6): δ 161.0 (C-9), 142.2 (C-3), 140.1 (C-10), 137.2 (q, $J = 4.5$ Hz, C-7a), 132.7 (C-12), 130.3 (C-11), 128.9 (C-13), 128.8 (C-5), 125.5 (q, $J = 4.8$ Hz, C-6), 125.3 (q, $J = 270.4$ Hz, CF_3), 120.2 (C-4), 119.6 (C-3a), 113.0 (q, $J = 31.4$ Hz, C-7). **EM** (EI) (m/z): 311 (35) $[M]^+$, 111 (100), 69 (15). **HRMS** ($C_{13}H_8F_3N_3OS$) $[M]$: calculado: 311.0335, hallado: 311.0336. **IR** (ATR, ν): 3271.2 (NH), 1644.7 (CO), 1601.8, 1550.0, 1508.1, 1457.9 (NH), 1416.1, 1356.7, 1320.3, 1286.3, 1269.2, 1214.5, 1150.7, 1113.5, 1087.1, 1054.1, 927.4, 887.6, 851.9, 804.8, 764.3, 751.8, 717.9, 695.1, 654.4, 596.8, 552.1 cm^{-1} .

***N*-[7-(Trifluorometil)-1*H*-indazol-3-il]-3-metil-2-butenamida (117)**

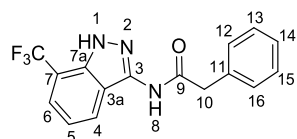


Reactivos: resina **R14** (0.253 mmol, 850.0 mg), ácido trifluoroacético (0.531 mmol, 60.6 mg, 0.041 mL). Purificación: acetato de etilo/ciclohexano (1:2). Rendimiento: sólido blanco (22.0

mg, 31%). **¹H RMN** (400 MHz, Acetona- d_6): δ 12.26 (s, 1 H, H-8), 9.56 (s, 1 H, H-1), 8.38 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, H-4), 7.73 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, H-6), 7.26 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H, H-5), 6.12 (hept, $J = 1.4$ Hz, 1 H, H-10), 2.26 (d, $J = 1.4$ Hz, 3 H, CH_3), 1.93 (d, $J = 1.4$ Hz, 3 H, CH_3). **¹³C RMN** (100 MHz, Acetona- d_6): δ 167.3 (C-9), 155.1 (C-11), 141.9 (C-3), 137.0 (m, C-7a), 127.3 (C-5), 125.3 (q, $J = 270.2$ Hz, CF_3), 125.2 (q, $J = 4.7$ Hz, C-6), 119.9 (C-10), 119.2 (C-4), 118.1 (C-3a), 113.3 (C-7), 27.1, 19.8 (C-12, C-13). **EM** (EI) (m/z): 283 (30) $[M]^+$, 201 (45), 83 (100), 55 (22). **HRMS** ($C_{13}H_{12}F_3N_3O$) $[M]$: calculado: 283.0927, hallado:

283.0929. **IR** (ATR, ν): 3277.4 (NH), 2923.6, 1662.5 (CO), 1645.7, 1601.6, 1546.3, 1505.6, 1453.0 (NH), 1421.8, 1317.3, 1271.5, 1245.5, 1213.2, 1151.4, 1112.2, 1088.8, 1051.5, 995.5, 926.5, 871.0, 842.9, 797.5, 747.1, 727.1, 692.7, 650.7, 596.7, 554.5, 463.2 cm^{-1} .

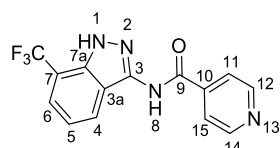
***N*-[7-(trifluorometil)-1*H*-indazol-3-il]bencilamida (118)**



Reactivos: resina **R15** (0.148 mmol, 500.0 mg), ácido trifluoroacético (0.312 mmol, 35.5 mg, 0.024 mL). Purificación: acetato de etilo/ciclohexano (1:2). Rendimiento: sólido blanco (16.0 mg, 34%).

¹H RMN (400 MHz, Acetona- d_6): δ 12.32 (s, 1H, H-8), 9.86 (s, 1 H, H-1), 8.18 (d, J = 7.4 Hz, 1 H, H-4), 7.71 (d, J = 7.4 Hz, 1 H, H-6), 7.46 (d, J = 7.3 Hz, 2 H, H-12, H-16), 7.35 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, H-13, H-15), 7.28 (t, J = 7.3 Hz, 1 H, H-14), 7.23 (t, J = 7.4 Hz, 1 H, H-5), 3.85 (s, 2 H, H-10). **¹³C RMN** (100 MHz, Acetona- d_6): δ 169.9 (C-9), 141.4 (C-3), 136.2 (q, J = 4.2 Hz, C-7a), 135.7 (C-11), 129.2 (C-12, C-16), 128.4 (C-13, C-15), 127.7 (C-5), 126.7 (C-14), 124.4 (q, J = 4.5 Hz, C-6), 124.3 (q, J = 270.4 Hz, CF_3), 119.0 (C-4), 118.2 (C-3a), 112.1 (q, J = 32.8 Hz, C-7), 42.6 (C-10). **EM** (EI) (m/z): 319 (60) [$\text{M}]^+$, 201 (100), 181 (12), 91 (70). **HRMS** ($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}$) [M]: calculado: 319.0927, hallado: 319.0928. **IR** (ATR, ν): 3273.5 (NH), 3030.8 (NH), 2925.1, 2400.6, 1665.9 (CO), 1614.0, 1593.9, 1524.3, 1498.8, 1453.8 (NH), 1429.6, 1391.6, 1338.8, 1306.0, 1220.0, 1184.4, 1152.8, 1116.9, 1103.0, 1049.5, 957.3, 902.8, 848.5, 806.8, 791.1, 748.7, 702.8, 637.4, 623.0, 597.5, 534.5, 490.6, 473.8 cm^{-1} .

***N*-[7-(Trifluorometil)-1*H*-indazol-3-il]isonicotinamida (119)**

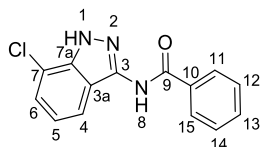


Reactivos: resina **R16** (0.268 mmol, 800.0 mg), ácido trifluoroacético (0.562 mmol, 64.1 mg, 0.043 mL). Purificación: metanol/diclorometano (1:30). Rendimiento: sólido blanco (24.0 mg, 29%).

¹H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 13.49 (s, 1 H, H-8), 11.34 (s, 1 H, H-1), 8.85 (sa, 2 H, H-12, H-14), 8.10 (d, J = 7.6 Hz, 1 H, H-4), 8.01 (d, J = 4.6 Hz, 2 H, H-11, H-15), 7.80 (d, J = 7.6 Hz, 1 H, H-6), 7.29 (t, J = 7.6 Hz, 1H, H-5). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO- d_6): δ 164.3 (C-9), 150.2 (C-12, C-14), 140.7 (C-3), 140.4 (C-10), 135.6 (m, C-7a), 127.0 (C-5), 124.5 (q, J = 4.9 Hz, C-6), 123.9 (q, J = 271.1 Hz, CF_3), 121.9 (C-11, C-15), 119.4 (C-4), 118.5 (C-3a), 111.6 (q, J = 33.7 Hz, C-7). **EM** (EI) (m/z): 306 (50) [$\text{M}]^+$, 106 (100), 78 (60), 69 (18). **HRMS** ($\text{C}_{14}\text{H}_9\text{F}_3\text{N}_4\text{O}$) [M]: calculado: 306.0849, hallado: 306.0848. **IR** (ATR, ν): 3272.9 (NH), 2913.0, 1657.3 (CO), 1600.0, 1551.4, 1508.1, 1467.8 (NH), 1421.7, 1356.3, 1321.5, 1281.2, 1214.2, 1164.7, 1107.5, 1085.1,

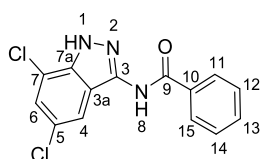
1046.6, 999.7, 921.0, 862.9, 845.8, 806.6, 786.1, 755.4, 740.4, 725.9, 655.3, 624.7, 595.6, 563.3, 502.8 cm^{-1} .

***N*-(7-Cloro-1*H*-indazol-3-il)benzamida (120)**



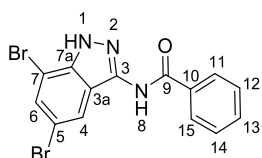
Reactivos: resina **R31** (0.095 mmol, 450.0 mg), ácido trifluoroacético (0.200 mmol, 22.8 mg, 0.015 mL). Purificación: acetato de etilo/ciclohexano (1:2). Rendimiento: sólido blanco (7.7 mg, 30%). **¹H RMN** (500 MHz, Acetona-*d*₆): δ 12.24 (s, 1 H, H-8), 9.90 (s, 1 H, H-1), 8.04 (d, J = 7.4 Hz, 2 H, H-11, H-15), 7.83 (d, J = 7.8 Hz, 1 H, H-4), 7.57-7.37 (m, 3 H, H-ar), 7.32 (t, J = 7.8 Hz, 1 H, H-6), 7.00 (t, J = 7.8 Hz, 1 H, H-5). **¹³C RMN** (125 MHz, Acetona-*d*₆): δ 165.7 (C-9), 141.2 (C-3), 138.4 (C-7a), 133.5 (C-10), 132.0 (C-13), 128.5 (C-12, C-14), 128.0 (C-11, C-15), 125.8 (C-6), 121.1 (C-5), 120.7 (C-4), 119.0 (C-7), 114.8 (C-3a). **EM** (EI) (m/z): 271/273 (27/9) [M]⁺, 131 (7), 105 (100). **HRMS** (C₁₄H₁₀ClN₃O) [M]: calculado: 271.0512, hallado: 271.0510.

***N*-(5,7-Dicloro-1*H*-indazol-3-il)benzamida (121)**



Reactivos: resina **R32** (0.134 mmol, 600.0 mg), ácido trifluoroacético (0.281 mmol, 32.0 mg, 0.021 mL). Purificación: acetato de etilo/ciclohexano (1:2). Rendimiento: sólido blanco (12.0 mg, 29%). **¹H RMN** (400 MHz, CDCl₃): δ 12.40 (s, 1H, H-8), 9.97 (s, 1 H, H-1), 7.94 (d, J = 7.6 Hz, 2 H, H-11, H-15), 7.87 (d, J = 1.5 Hz, 1 H, H-6), 7.54 (t, J = 7.2 Hz, 1 H, H-13), 7.48-7.44 (m, 2 H, H-12, H-14), 7.31 (d, J = 1.7 Hz, 1 H, H-4). **¹³C RMN** (100 MHz, CDCl₃): δ 166.7 (C-9), 140.1 (C-7a), 137.9 (C-3), 133.2 (C-10), 132.3 (C-5), 128.6 (C-12, C-14), 127.6 (C-11, C-15), 126.8 (C-13), 125.5 (C-6), 120.7 (C-4), 117.9 (C-3a), 116.4 (C-7). **EM** (EI) (m/z): 305/307/308 (20/15/6) [M]⁺, 105 (100), 77 (40), 69 (12). **HRMS** (C₁₄H₉Cl₂N₃O) [M]: calculado: 305.0117, hallado: 305.0116. **IR** (ATR, ν): 3251.8 (NH), 2417.6, 1648.0 (CO), 1576.7, 1541.7, 1513.7, 1478.9 (NH), 1447.6, 1414.6, 1387.8, 1322.0, 1125.5, 1058.5, 1013.5, 931.7, 905.9, 867.4, 850.5, 788.5, 738.3, 710.6, 690.5, 666.4, 625.4, 602.7, 559.5, 510.6, 483.6, 410.4 cm^{-1} .

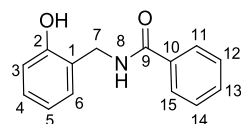
***N*-(5,7-Dibromo-1*H*-indazol-3-il)benzamida (122)**



Reactivos: resina **R33** (0.145 mmol, 520.0 mg), ácido trifluoroacético (0.305 mmol, 34.7 mg, 0.023 mL). Purificación: acetato de etilo/ciclohexano (1:2). Rendimiento: sólido blanco (15.0 mg, 26%). **¹H RMN** (300 MHz, Acetona-*d*₆): δ 12.38 (s, 1 H, H-8), 9.98 (s, 1 H, H-1), 8.15 (d, J = 1.6 Hz, 1 H, H-4), 8.04 (d, J = 7.3 Hz, 2 H, H-11, H-15), 7.62 (d, J = 1.6 Hz, 1 H, H-6), 7.57-7.47 (m, 2 H, H-12, H-14), 7.44 (t, J = 7.3 Hz, 1 H, H-13). **EM** (EI)

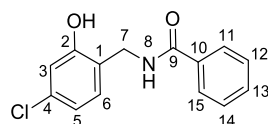
(*m/z*): 393/395/397 (7/13/3) [*M*]⁺, 201 (100), 181 (15), 57 (15). **HRMS** (C₁₄H₉Br₂N₃O) [*M*]: calculado: 392.9107, hallado: 392.9105. **IR** (ATR, *v*): 3239.3 (NH), 2915.7, 2847.8, 1739.4 (CO), 1572.4, 1532.6, 1448.6 (NH), 1377.9, 1323.3, 1260.9, 1099.8, 919.9, 851.6, 788.7, 692.6, 658.2, 614.8, 590.7, 405.9 cm⁻¹.

***N*-(2-Hidroxibencil)benzamida (123)**



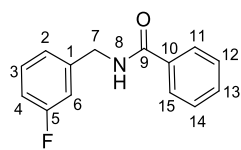
Reactivos: resina **R34** (0.610 mmol, 2.0 g), ácido trifluoroacético (1.281 mmol, 146.0 mg, 0.098 mL). Purificación: acetato de etilo/ciclohexano (1:2). Rendimiento: sólido blanco (39.0 mg, 28%). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ 9.55 (s, 1 H, OH), 7.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 2 H, H-11, H-15), 7.56-7.47 (m, 1 H, H-ar), 7.40 (t, *J* = 7.5 Hz, 2 H, H-12, H-14), 7.27-7.20 (m, 1 H, H-ar), 7.16 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1 H, H-ar), 6.84 (td, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 1 H, H-ar), 4.57 (d, *J* = 6.5 Hz, 2 H, H-7). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃): δ 169.1 (C-9), 156.1 (C-2), 133.9 (C-10), 131.3 (C-13), 128.9 (C-4), 128.2 (C-6), 128.1 (C-11, C-15), 126.8 (C-12, C-14), 124.4 (C-1), 119.1 (C-3), 115.1 (C-5), 39.0 (C-7). **EM** (EI) (*m/z*): 227 (40) [*M*]⁺, 210 (30), 105 (100), 77 (48). **HRMS** (C₁₄H₁₃NO₂) [*M*]: calculado: 227.0941, hallado: 227.0941. **IR** (ATR, *v*): 3335.4 (NH), 2584.2, 1600.8 (CO), 1584.5, 1551.4, 1487.1 (NH), 1439.2, 1348.8, 1311.0, 1256.2, 1227.8, 1180.8, 1109.1, 1030.1, 937.9, 819.5, 797.5, 751.3, 728.0, 705.6, 687.2, 633.9, 575.4, 519.6 cm⁻¹.

***N*-(4-Cloro-2-hidroxibencil)benzamida (124)**



Reactivos: resina **R35** (0.263 mmol, 940.0 mg), ácido trifluoroacético (0.552 mmol, 63.0 mg, 0.042 mL). Purificación: acetato de etilo/ciclohexano (1:2). Rendimiento: sólido blanco (23.0 mg, 33%). **¹H RMN** (300 MHz, CDCl₃): δ 9.87 (s, 1 H, OH), 7.79 (d, *J* = 7.4 Hz, 2 H, H-11, H-15), 7.56 (t, *J* = 7.4 Hz, 1 H, H-13), 7.46 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H, H-12, H-14), 7.07 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H, H-6), 6.99 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H, H-3), 6.93 (s, 1 H, H-8), 6.82 (dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, 1 H, H-5), 4.53 (d, *J* = 6.6 Hz, 2 H, H-7). **¹³C RMN** (75 MHz, CDCl₃): δ 170.0 (C-9), 157.1 (C-2), 135.4 (C-10), 132.7 (C-ar), 132.6 (C-ar), 131.7 (C-ar), 128.9 (C-11, C-15), 127.2 (C-12, C-14), 122.7 (C-ar), 119.9 (C-ar), 118.5 (C-ar), 40.6 (C-7). **EM** (EI) (*m/z*): 261/263 (43/15) [*M*]⁺, 105 (100), 77 (45), 69 (20). **HRMS** (C₁₄H₁₂ClNO₂) [*M*]: calculado: 261.0551, hallado: 261.0550. **IR** (ATR, *v*): 3326.8 (NH), 2536.2, 1622.9 (CO), 1600.0, 1551.2, 1487.0 (NH), 1382.6, 1312.9, 1274.8, 1227.8, 1180.8, 1081.4, 1028.9, 1011.3, 965.4, 934.3, 909.5, 865.3, 830.1, 809.4, 790.4, 716.4, 691.7, 638.0, 596.8, 568.5, 544.1, 501.8, 473.5, 421.9 cm⁻¹.

***N*-(3-Fluorobencil)benzamida (125)**

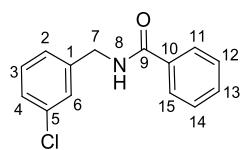


Reactivos: resina **R36** (0.250 mmol, 900.0 mg), ácido trifluoroacético (0.525 mmol, 59.9 mg, 0.040 mL). Purificación: acetato de etilo/ciclohexano (1:2). Rendimiento: sólido blanco (17.0 mg, 30%). ¹H

RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.73 (d, *J* = 7.0 Hz, 2 H, H-11, H-15), 7.48-

7.40 (m, 1 H, H-ar), 7.36 (t, *J* = 7.0 Hz, 2 H, H-12, H-14), 7.30-7.15 (m, 1 H, H-ar), 7.05 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H, H-2), 6.98 (d, *J* = 9.5 Hz, 1 H, H-6), 6.90 (m, 1 H, H-ar), 4.57 (d, *J* = 5.8 Hz, 2 H, H-7). ¹³C **RMN** (75 MHz, CDCl₃): δ 168.1 (C-9), 166.1 (d, *J* = 212.1 Hz, C-4), 140.8 (C-2), 134.1 (C-10), 131.7 (C-13), 130.3 (C-6), 128.6 (C-11, C-15), 127.0 (C-12, C-14), 123.3 (C-1), 114.6 (d, *J* = 21.1 Hz, C-3 o C-5), 114.5 (d, *J* = 21.8 Hz, C-3 o C-5), 43.5 (C-7). **EM** (EI) (*m/z*): **HRMS** (C₁₄H₁₂FNO) [*M*]: calculado: 229.0903, hallado: 229.0905. **IR** (ATR, ν): 3271.5 (NH), 2922.5, 1636.2 (CO), 1613.7, 1589.2, 1546.2, 1487.5 (NH), 1445.4, 1414.9, 1355.0, 1312.9, 1247.9, 1127.0, 1074.8, 1027.5, 993.8, 912.3, 869.0, 805.6, 777.6, 744.2, 695.5, 620.6, 525.6, 458.8, 438.4, 411.6 cm⁻¹.

***N*-(3-Clorobencil)benzamida (126)**

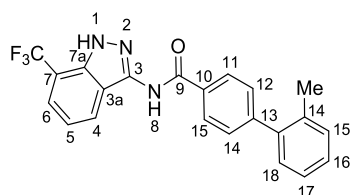


Reactivos: resina **R37** (0.240 mmol, 850.0 mg), ácido trifluoroacético (0.503 mmol, 57.3 mg, 0.038 mL). Purificación: acetato de etilo/ciclohexano (1:2). Rendimiento: sólido blanco (20.0 mg, 34%). ¹H

RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-11, H-15), 7.44

(t, *J* = 8.4 Hz, 1 H, H-13), 7.37 (t, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H-12, H-14), 7.27-7.20 (m, 4 H, H-ar), 4.56 (d, *J* = 5.8 Hz, 2 H, H-7). ¹³C **RMN** (75 MHz, CDCl₃): δ 167.5 (C-9), 140.4 (C-2), 134.8 (C-10), 134.2 (C-4), 131.9 (C-13), 130.2 (C-6), 128.8 (C-11, C-15), 128.1 (C-3), 128.0 (C-5), 127.1 (C-12, C-14), 126.1 (C-1), 43.6 (C-7). **EM** (EI) (*m/z*): 245/247 (43/15) [*M*]⁺, 105 (100), 77 (55). **HRMS** (C₁₄H₁₂ClNO) [*M*]: calculado: 245.0607, hallado: 245.0607. **IR** (ATR, ν): 3284.7 (NH), 2920.9, 1636.6 (CO), 1596.7, 1543.0, 1474.0 (NH), 1414.8, 1352.1, 1312.4, 1255.5, 1194.7, 1094.1, 1076.2, 1026.3, 1312.4, 1255.5, 1194.7, 1094.1, 1076.2, 1026.3, 988.7, 882.4, 844.6, 805.2, 775.8, 694.4, 683.1, 614.9, 524.0, 452.4, 429.3, 415.8 cm⁻¹.

***N*-[7-(Trifluorometil)-1*H*-indazol-3-il]-(2'-metil-4,1'-bifenil)-1-carboxamida (127)**



Reactivos: resina **R39** (0.113 mmol, 500.0 mg), ácido trifluoroacético (0.237 mmol, 27.0 mg, 0.018 mL).

Purificación: acetato de etilo/ciclohexano (1:2). Rendimiento: sólido blanco (16.0 mg, 36%). ¹H **RMN** (400 MHz, DMSO-*d*₆):

δ 13.41 (s, 1 H, H-8), 11.06 (s, 1 H, H-1), 8.18 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H, H-11, H-15), 8.09 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H, H-4), 7.79 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H, H-6), 7.54 (d, *J* =

8.3 Hz, 2 H, H-12, H-14), 7.37-7.25 (m, 5 H, H-ar), 2.29 (s, 3 H, H-22). **¹³C RMN** (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 165.5 (C-9), 144.9 (C-3), 141.1 (C-ar), 140.3 (C-ar), 135.6 (q, *J* = 4.2 Hz, C-7a), 134.7 (C-ar), 131.9 (C-ar), 130.5 (C-ar), 129.4 (C-ar), 129.1 (C-12, C-14), 128.0 (C-11, C-15), 127.8 (C-ar), 127.1 (C-5), 126.1 (C-ar), 124.4 (q, *J* = 4.8 Hz, C-6), 124.0 (q, *J* = 271.2 Hz, CF₃), 119.2 (C-4), 118.8 (C-3a), 111.5 (q, *J* = 33.5 Hz, C-7), 20.1 (CH₃). **EM** (EI) (*m/z*): 395 (35) [M]⁺, 195 (100), 165 (15), 152 (20). **HRMS** (C₂₂H₁₆F₃N₃O) [M]: calculado: 395.1242, hallado: 395.1240. **IR** (ATR, ν): 3270.9 (NH), 1650.9 (CO), 1547.9, 1508.0, 1456.5 (NH), 1421.5, 1352.2, 1321.8, 1271.0, 1215.8, 1152.5, 1111.3, 1086.2, 1049.7, 1023.8, 993.5, 928.5, 905.3, 849.1, 825.8, 803.3, 788.6, 754.33, 726.3, 697.8, 651.7, 596.8, 446.7 cm⁻¹.

2. PROCEDIMIENTOS BIOLÓGICOS

2.1. Predicción de la capacidad de penetración en el sistema nervioso central

En el método PAMPA-BBB¹¹³ se utilizaron como patrones compuestos comerciales con permeabilidad en cerebro conocida.

- *Materiales:*

Compuestos comerciales de Sigma Aldrich y Fluka. Lípido de cerebro porcino (PBL) de Avanti Polar Lipids, Inc (nº catalogo 141101) disuelto en dodecano (20 mg/ mL). Solución tampón: EtOH 30% v/v en tampón fosfato salino (PBS) a pH = 7.4. Placa aceptora: placa de 96 pocillos (Multiscreen®, nº catalogo MAIPN4550, membrana PVDF, tamaño de poro: 0.45 μM) de Millipore. Placa donadora: placa de 96 pocillos de "lágrima" de pION. Placa de 96 pocillos para UV (COSTAR®) de pION.

- *Instrumentación:*

Espectrofotómetro de UV de placas de 96 pocillos (Multiskan spectrum de Thermoscientific).

- *Procedimiento*

Se determinaron las longitudes de ondas del espectro de absorción de cada derivado, cuyos niveles de absorbancia estaban situados entre 1-0.8 para posteriormente medir cada permeabilidad, utilizando una disolución de cada compuesto (1 mg en 5 mL de PBS/EtOH 70:30). Con estas disoluciones madre se miden los niveles de absorbancia inicial a las longitudes de onda determinadas anteriormente. Estos valores serán comparados con los niveles obtenidos en la placa aceptora al final del ensayo. A las longitudes de onda seleccionadas se miden los niveles de absorbancia al final del ensayo.

Para ello, se añade 180 μL de cada disolución (1 mg de compuesto en 5 mL de PBS/EtOH 70:30) a cada pocillo de la placa donadora. La membrana artificial se cubre con 4 μL de una solución de PBL en dodecano 20 mg/mL. A la placa aceptora se le añade 180 μL de la solución tampón. A continuación formamos un sistema tipo *sandwich* de manera que la placa donadora queda encima de la placa aceptora a través de la membrana artificial. Este sistema se incuba durante 4 h sin agitación a temperatura ambiente. Los niveles de absorbancia de la placa aceptora se miden utilizando un espectrofotómetro de UV en una placa de 96 pocillos con 130 μL en cada uno. Los resultados se expresan como el valor medio de tres ensayos independientes conteniendo cada uno tres repeticiones de cada compuesto.

2.2. Estudio de la oxidación metabólica *in vitro* de los derivados de diarilsulfuro 48 y 73

- *Materiales:*

Tampón fosfato salino (PBS) a pH = 7.4. Cloruro de magnesio de Sigma Aldrich. Microsomas hepáticos de rata (20 mg/mL), cofactor NADPH. DMSO de Sigma Aldrich. Derivados **48** y **73** sintetizados previamente según se encuentra descrito en esta parte experimental.

- *Instrumentación:*

Centrífuga Hettich modelo Mikro 12-24; Cromatógrafo de HPLC Finningan Surveyor con un detector de UV Photodiode Array modelo Waters 2996 acoplado a un detector de EM Pump Plus, cuyos valores se expresan en unidades de masa (m/z). Se utilizó una columna SunFire™ C15, 3.5 μm , 4.6 nm x 50 nm y como eluyente mezclas de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, en gradiente 10:100 en 90 minutos.

- *Procedimiento*

Se preparan las siguientes disoluciones: disolución tampón de PBS en agua destilada (pH = 7.4); disolución stock de los derivados **48** o **73** (2.5 mM en DMSO), que posteriormente se diluye hasta una concentración final de 1.25 mM; disolución de NADPH en PBS (mantener en congelador); disolución de microsomas hepáticos de rata a una concentración de 1mg/mL, preparada por dilución de la disolución comercial (20 mg/mL) con PBS.

Para llevar a cabo el experimento, se prepara por un lado el blanco o control y por otro el experimento en cuestión. Los volúmenes de cada una de las disoluciones anteriormente preparadas que contienen ambas muestras se indican en la tabla:

| Disoluciones | MgCl ₂ | Sulfuro | Microsomas | NADPH | PBS | Vfinal |
|--------------|-------------------|---------|------------|--------|--------|--------|
| Control | 50 µL | 20 µL | 50 µL | - | 880 µL | 1 mL |
| Experimento | 50 µL | 20 µL | 50 µL | 100 µL | 780 µL | 1 mL |

La muestra control corresponde a tiempo 0. Puesto que el NADPH es el encargado de desencadenar la reacción enzimática, el tiempo se cuenta a partir de la adición de este cofactor al experimento. Se toman alícuotas de 150 µL de dicho experimento a tiempos 15, 30 y 60 minutos y a cada una de ellas se les adicionan 150 µL de acetonitrilo con el fin de detener la reacción enzimática. Estas alícuotas se centrifugan con el fin de hacer precipitar los microsomas, y se toman 200 µL del sobrenadante, los cuales se inyectan directamente en el HPLC-MS. Las muestras se analizaron, comenzando con un gradiente CH₃CN/H₂O (10:100), durante 90 minutos, detectándose los picos de absorción correspondientes a los productos formados en el experimento.

3. PROCEDIMIENTOS COMPUTACIONALES

3.1. Preparación de las estructuras químicas de los ligandos

Las estructuras químicas fueron seleccionadas de la quimioteca de nuestro grupo de investigación, que contiene unos 900 heterociclos. La representación de las estructuras se llevó a cabo con el programa ChemDraw® vs. 12.0. Una vez dibujadas las estructuras, se obtiene el código SMILES (formato .smi) y este archivo se utiliza como entrada para la preparación de los ligandos para el docking mediante la herramienta *Ligprep* del programa Maestro de Schrödinger vs 9.2, que genera un archivo de ligandos en formato MDL SDFFile (.sdf). Los parámetros dados para generar los ligandos fueron los siguientes: número máximo de átomos por ligando: 300; número máximo de isómeros por ligando: 8; número máximo de tautómeros por ligando: 6; generación todos los estados de protonación posibles entre pH 1 y pH 7. A continuación, se asignaron las cargas mediante el campo de fuerzas MMFF94^{173,174,175}, y la minimización de las estructuras generadas se llevó a cabo empleando este mismo campo de fuerzas con un gradiente de 0.01 kcal/mol.

¹⁷³ Haldren, T.A. "Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94" *J. Comput. Chem.* **1996**, 17, 490-519.

¹⁷⁴ Haldren, T.A. "Merck molecular force field. II. MMFF94 van der Waals and electrostatic parameters for intermolecular interactions" *J. Comput. Chem.* **1996**, 17, 520-552.

¹⁷⁵ Haldren, T.A. "MMFF VI. MMFF94s option for energy minimization studies" *J. Comput. Chem.* **1999**, 20, 720-729.

3.2. Preparación de la estructura de las proteínas

Las estructuras cristalográficas de PDE7A y PDE10A utilizadas se indican a continuación:

Dominio catalítico de PDE7A (código PDB: 1ZKL)¹⁷⁶

Dominio catalítico de PDE10A (código PDB: 2OUP)²²

Dominio GAF de PDE10A (código PDB: 2ZMF)⁸³

En los 3 casos, la cadena B (dado que cada proteína está cristalizada como dímero) y las aguas de cristalización fueron eliminadas, conservándose solamente aquellas que están coordinadas con los cationes divalentes Zn^{2+} y Mg^{2+} en el sitio activo de la proteína. A continuación, la proteína fue preparada utilizando la herramienta *PrepWizard* del programa Maestro vs. 9.2 de Schrödinger. Se llevó a cabo la adición de los hidrógenos a la estructura proteica, también se adicionaron residuos neutros en el dominio terminal y, posteriormente, se llevó a cabo la minimización utilizando el campo de fuerzas y las cargas MMFF94 con un gradiente de 0.01 kcal/mol empleando el programa SybylX 2.0¹⁷⁷.

3.3. Cribado virtual

3.3.1. Cribado virtual sobre el dominio catalítico de PDE10A

La cavidad sobre la que se realizó el cribado se generó mediante la función *rbcavity* que posee rDock. Para ello, se define como volumen de la cavidad un ligando imaginario generado de tal manera que cubriese el hueco ocupado por la superposición de todos los ligandos cristalizados disponibles en el PDB para las diferentes estructuras de PDE10A. Los parámetros (tamaño y coordenadas) de dicha cavidad vienen definidos en el archivo .prm que esta función da como resultado.

El docking se llevó a cabo mediante el comando *rbdock*. Como ficheros de entrada se utilizaron tres: las estructuras de los ligandos (formato .sdf), los parámetros de la cavidad (formato .prm) y los parámetros del docking (formato .prm), que se utilizaron los que tiene el programa por defecto. Únicamente se especificó que se generasen 50 poses para cada uno de los ligandos. Como ligandos control se utilizaron aquellos que aparecen cristalizados en las estructuras 3HQP⁹⁷, 3HQY⁹⁷, 3HQZ⁹⁷ y 3SN7¹⁰². Las soluciones fueron ordenadas según la función de puntuación que posee el programa y, de entre todos los ligandos, se seleccionaron aquellos que tenían una puntuación igual o superior a

¹⁷⁶ Wang, H.; Liu, Y.; Chen, Y.; Robinson, H.; Ke, H. "Multiple elements jointly determine inhibitor selectivity of cyclic nucleotide phosphodiesterases 4 and 7" *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 30949-30955.

¹⁷⁷ Ghose, A.; Jaeger, E.; Kowalczyk, P.; Peterson, M.; Treasuryswala, A. "Conformational searching methods for small molecules. I. Study of the SYBYL SEARCH Method" *J. Comput. Chem.* **1993**, 14, 1050-1065.

los de referencia. Para cada uno de estos ligandos, se seleccionaron las 10 mejores poses para llevar a cabo la inspección visual con el programa Pymol vs 1.3.

3.3.2. Cribado virtual sobre el dominio GAF de PDE10A

La cavidad se generó centrada en el sitio de unión del AMPc en este dominio GAF de la proteína, con un tamaño de 20x20x20 Å. El docking se llevó a cabo empleando el modo SP que posee el programa Glide vs. 9.2 de Schrödinger, y se utilizaron las condiciones por defecto, especificando únicamente que se generasen 20 poses por cada uno de los ligandos. Como ligando control se utilizó el AMPc. A continuación, se ordenaron las soluciones obtenidas según la función de puntuación que posee el programa, y se seleccionaron para inspección visual aquellas soluciones que tenían una puntuación mejor que la correspondiente al ligando control.

3.4. Docking focalizado sobre PDE7A y PDE10A

Para llevar a cabo los estudios de docking de los derivados de diarilsulfuro, se empleó la estructura cristalográfica de la enzima PDE7A depositada en el Protein Data Bank (código PDB: 1ZKL)¹⁷³. Como ligando de referencia, se utilizó el inhibidor de PDEs IBMX. La malla empleada para el docking se centró en los residuos del sitio activo de la enzima (Phe384, Gln413 y Phe416), con un tamaño de 20x20x20 Å. El docking fue llevado a cabo empleando el modo XP (*extra precision*) que posee el programa, con un máximo de 50 poses por ligando. Posteriormente, el complejo ligando-proteína fue minimizado empleando el campo de fuerzas OPLS2005.

Para llevar a cabo los estudios de docking de los derivados de imidazol en el dominio catalítico de PDE10A, se empleó la estructura cristalográfica de esta enzima depositada en el Protein Data Bank (código PDB: 2OUP)²². Como ligandos de referencia, se utilizaron los mismos que en el cribado virtual llevado a cabo sobre el dominio catalítico. La malla empleada para el docking se centró en los residuos del sitio activo de la enzima (Phe729, Gln726 y Phe696), con un tamaño de 20x20x20 Å. El docking fue llevado a cabo empleando el modo XP, con un máximo de 50 poses por ligando. A continuación, se llevó a cabo la minimización del conjunto ligando-proteína en cada caso el campo de fuerzas y las cargas MMFF94 con un gradiente de 0.01 kcal/mol utilizando el programa Sybyl.

3.5. Análisis comparativo del modo de unión de los derivados de imidazol y maleidimida en los dominios catalítico y GAF de PDE10A

Para llevar a cabo los estudios de docking del derivado de imidazol **Im2** y la maleidimida **Mal4**, se emplearon las estructuras cristalográficas depositadas en el Protein Data Bank para el dominio catalítico (código PDB: 2OUP)²² y el GAF (PDB: 2ZMF)⁸³. Como ligandos de referencia, se utilizaron tanto el AMPc como el GMPc en ambos dominios. La malla empleada para el docking en cada caso es la misma que se ha empleado en cada uno de los cribados virtuales anteriores. El docking fue llevado a cabo empleando el modo XP, con un máximo de 20 poses por ligando. A continuación, se llevó a cabo la minimización del conjunto ligando-proteína en cada caso el campo de fuerzas y las cargas MMFF94 con un gradiente de 0.01 kcal/mol utilizando el programa SybylX 2.0.

3.6. Determinación de las cavidades en la superficie del dominio catalítico de PDE10A

El programa *Fpocket*® se encuentra disponible en <http://fpocket.sourceforge.net> y se utilizó con el fin de encontrar posibles sitios de unión en la superficie del dominio catalítico de PDE10A, distintos del sitio de unión de AMPc/GMPc. Las estructuras cristalográficas utilizadas para el estudio teórico se obtuvieron de *Protein Data Bank* (www.pdb.org). Así, se emplearon únicamente aquellas estructuras cristalizadas existentes en el momento del estudio que perteneciesen al organismo *Homo Sapiens* y que presentasen ninguna mutación. Se seleccionaron así las 15 estructuras con las que se realizó el estudio, identificadas con los siguientes códigos en el PDB: 2OUN, 2OUP, 2OUQ, 2WEY, 2Y0J, 3SN7, 3SNI, 3SNL, 3UI7, 3UUO, 4AEL, 4DDL, 4DFF, 4FCB, 4FCD.

Tanto los ligandos presentes en la estructura cristalizada de la enzima como las moléculas de agua fueron eliminados utilizando el programa *Pymol*®, mientras que las aguas de coordinación y los metales (Zn y Mg) presentes en la estructura se mantuvieron. Como datos de entrada se emplearon los ficheros de PDB modificados. Tras el análisis con *Fpocket*®, éste devuelve un conjunto de esferas encontradas para cada estructura. Todas las estructuras fueron analizadas visualmente con el objetivo de determinar aquellas cavidades comunes en todas las estructuras de PDEs o al menos en la mayoría de ellas. Posteriormente, las estructuras cristalinas se superpusieron con los resultados obtenidos en *Fpocket* para confirmar en todas ellas que el bolsillo número 1 encontrado por el programa coincidía con el sitio catalítico.

ABSTRACT

Introduction

Neurodegenerative diseases are characterized by the progressive loss of neurons in a specific part of the brain. These pathologies share an unknown aetiology, the progressive destruction of specific areas of the brain and the lack of an effective treatment. Although their aetiology is not well understood, it is likely to involve both genetic and environmental factors. In this context, some common mechanisms which could trigger neuronal death have been identified, as excitotoxicity, oxidative stress, the accumulation of intracellular or extracellular protein aggregates, due to a missfolding of certain proteins; and neuroinflammation, among others. Since cAMP levels play an important role in neuroprotection and neuroinflammation, PDEs have emerged as new potential targets for the regulation of inflammatory process, because their inhibition could control the levels of this nucleotide.

PDEs selectively degrade cyclic purine nucleotides cAMP and cGMP to their inactive 5'-monophosphate forms. This family of enzymes has been classified into 11 groups, according to their sequence homology, cellular distribution and sensitivity to different PDEs inhibitors. PDE4, PDE7 and PDE8 are cAMP-specific PDEs while PDE3, PDE5 and PDE9 are cGMP-specific PDEs. The rest of them are dual ones. According to their distribution in the central nervous system, PDE7, PDE8 and PDE10 could be considered attractive therapeutic targets to control the inflammatory process which trigger neuronal death. That means inhibition of high-expressed in brain PDEs could be considered a novel and promising strategy in order to find a neurodegenerative-modified treatment for these unmet pathologies.

Objectives

Since the treatments available for central nervous system diseases are palliative, there is an urgent needed of new treatments able to stop or delay the underlined neurodegenerative process. Having into account the possibility to control cAMP levels by inhibition of PDEs high-expressed in central nervous system, the aim of this work is the design and synthesis of new PDE7, PDE10 and PDE8 inhibitors, which could validate the important role of these enzymes in central nervous system (CNS) diseases, as well as be used as effective treatment for these pathologies.

Results and discussion

The thesis is divided into three chapters:

Chapter 1. Phosphodiesterase 7 as therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases.

In the first chapter, PDE7 inhibitors have been developed following two different approaches. The first one consists on the development of new analogues of the quinazoline **S14**, a PDE7 inhibitor previously described, whose clinical development is ongoing. The synthesis of 18 quinazoline derivatives have been carried out by microwave-assisted organic synthesis (MAOS), and after their isolation and characterization, they were evaluated against PDE7A. Most of these derivatives have submicromolar potency against PDE7A enzyme. Furthermore, they have shown a good pharmacological profile: most of them are able to cross the blood-brain barrier (BBB), to increase the survival of cells treated with 6-OHDA, and have shown neuroprotective properties in primary cell cultures treated with LPS, a lipopolysaccharide which induces inflammation. That means these new PDE7 quinazoline-type inhibitors might be used as replacement compounds of S14 for the treatment of Parkinson's disease, which guarantees the final success of the clinical trial program. Moreover, since PDE7 inhibition has shown a great potential in multiple sclerosis, derivative **19** has been tested in a murine model of EAE, commonly used to study drug candidates for multiple sclerosis, showing a significant decrease into the clinical score of the animals.

Secondly, we used a chemical genetic approach in a cellular model of Parkinson disease in order to find new candidates for the treatment of this pathology. As a result, a new diarylsulfide derivative, **SC072**, was identified as a hit, and subsequently we developed a new PDE7 inhibitor family by the introduction of some chemical modifications in order to study structure-activity relationship of these kinds of compounds. In general, these new derivatives were synthesized by nucleophilic aromatic substitution of the corresponding aryl halides, using thiol or alkoxy derivatives as nucleophilic agents. More than 50 compounds were synthesized and they were tested for their inhibitory potencies against PDE7A. Some of them presented IC₅₀ values in the low micromolar range, so we decided to select the most potent ones for further pharmacological characterization. In this context, they showed efficacy in cellular model of Parkinson's disease and inflammation, selectivity among other PDEs and good permeability to BBB. Moreover, compounds **48** and **73** were selected to study their binding mode, both theoretically and experimentally, showing they are competitive with cAMP. Moreover, compound **48** was used to demonstrate the absence of emetic effects associated with this sulfide-like family of PDE7 inhibitors, and in addition, the same results were obtained with other chemically diverse families of PDE7 inhibitor, which enhances the therapeutic potential of this enzyme because their inhibitors are both effective and safe drugs (**figure 1**).

Finally, for further characterization of ADME properties, the corresponding metabolites from *in vitro* metabolic process using rat hepatic microsomes were identified by comparison to chemical oxidated compounds, which were previously isolated and characterized by NMR and mass spectroscopy.

It is noteworthy to mention that all the new quinazoline and sulfide-like PDE7 inhibitors were fully characterized according to analytic and spectroscopic techniques.

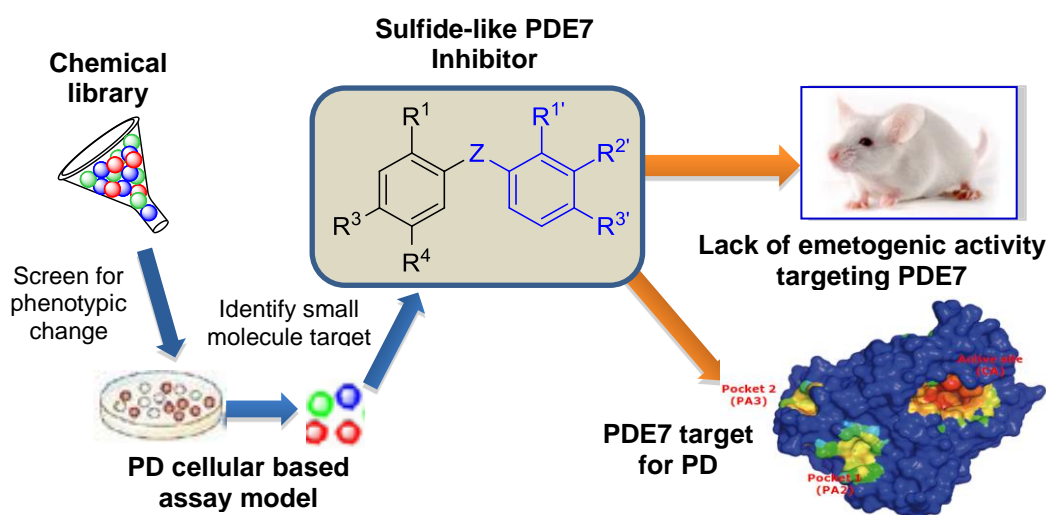


Figure 1. Sulfide-like PDE7 inhibitors identified by phenotypic screening and validation of chemically diverse PDE7 inhibitors as non-emetogenic drugs.

Chapter 2. Identification and development of new PDE10A inhibitors for their study in models of Parkinson's disease.

PDE10A is a dual PDE highly expressed in striatum, an area of brain which represents the input and output of information related to basal ganglia circuit. Since this circuit is associated with motor functions, PDE10A inhibitors could play an important role in neurological diseases which also present motor symptoms, such as Huntington's disease and Parkinson's disease.

In this chapter, computational studies have been used to identify new PDE10A inhibitors chemically diverse. First of all, carrying out a virtual screening on the catalytic domain of this enzyme, some imidazole-based compounds were identified as hits. Some more derivatives based on imidazole core were synthesized and their theoretical binding mode was studied. Afterwards, they were tested in cellular models of Parkinson's disease and additionally, one of these derivatives has shown efficacy in animal models of this pathology, which has allowed us to validate PDE10A as target for Parkinson's disease (figure 2A).

Moreover, a computational study to look for new cavities in the catalytic domain of the enzyme was carried out by using F-Pocket program, and it allowed us to identify some important differences between PDE7 and PDE10, which could be useful to modify their catalytic activities in an allosteric way.

Finally, since PDE10A has a GAF domain in its regulatory one, which could be used as an allosteric modulation cavity, we developed a virtual screening based on this domain, and we identified some maleimide-based compounds which inhibit PDE10A in micromolar range. Further experimental studies are ongoing to confirm our theoretical hypothesis (**figure 2B**).

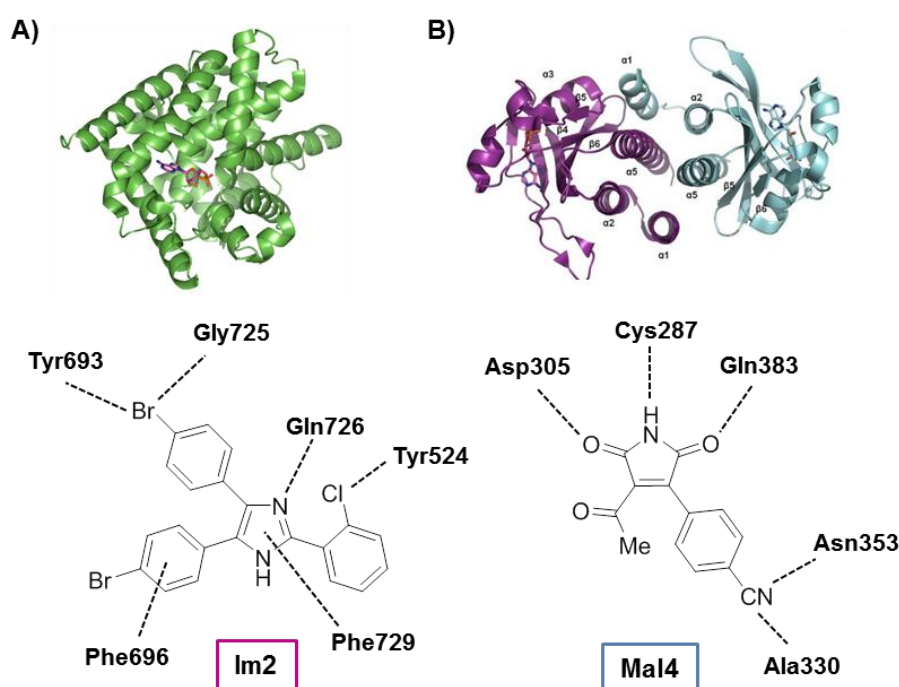
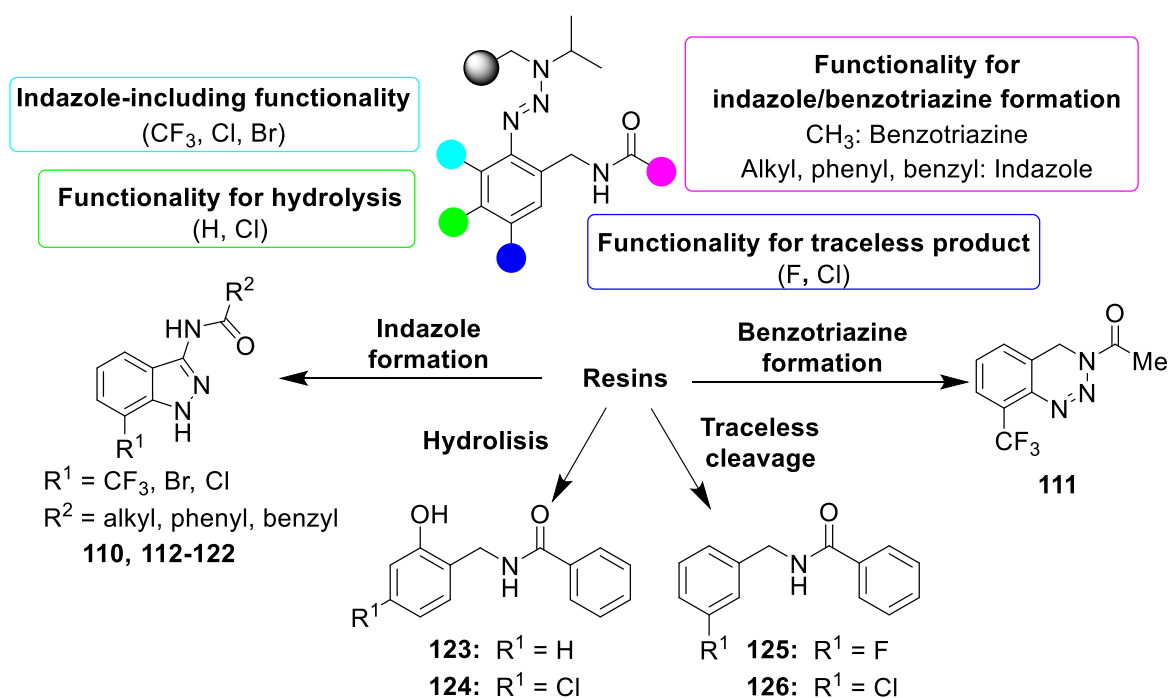


Figure 2. Families of compounds identified as PDE10A inhibitors. **(A)** Imidazole-based compound as catalytic site inhibitors. **(B)** Maleimide derivatives as allosteric modulators.

Chapter 3. Design of PDE8 inhibitors and synthesis of new 3-acylindazole derivatives using solid-phase organic synthesis.

PDE8 has recently been identified as a new attractive target for the treatment of neurological disease, because it is overexpressed in Alzheimer's disease patient brain and also it is involved in movement disorders, as Parkinson's disease and Huntington's disease. As starting point of our work in PDE8 as a target for central nervous system disease, we have designed, based on the enzyme structure, some new indazole derivatives which could be potential PDE8 inhibitors. The new indazoles were synthesized by solid phase organic synthesis, using triazene linker T1. The required nitrogen atoms are originated from diazonium salts being cleaved from triazene resins.

We have tried some different carboxylic acids/chloride acids and 2-aminobenzonitriles as starting materials in order to study the structural requirements for indazole formation (**scheme 1**). We have found that 3-substitued-2-aminobenzonitriles are necessary as starting materials for heterocycle formation and that, only when we used methyl chloride acid, benzotriazine is obtained instead of indazole. The employment of different 2-aminobenzonitriles yield, after cleavage, side products corresponding to traceless or hydrolyzed ones. These new indazole compounds are going to be tested as PDE8A inhibitors in near future.



Scheme 1. Products obtained using different 2-aminobenzonitriles as starting materials.

Conclusions

In this work, new PDE7 and PDE10A inhibitors were designed as potential therapeutic agents for the treatment of central nervous system diseases.

Regarding PDE7, we have obtained some quinazoline-type inhibitors based on S14 structure, whose clinical trial development is ongoing, to guarantee the success of the program. Moreover, a sulfide-like family of inhibitors have been developed, which has allowed us to demonstrate the absence of emetogenic effects related to PDE7 inhibition.

Related to PDE10A, it has been identified a new imidazole-type inhibitors, which have demonstrated to be effective in a cellular model of Parkinson's disease, and are being tested in an animal model of the disease. Furthermore, we have initiated the identification

of allosteric modulators based on new identified cavities in the catalytic domain of the enzyme, as well as based on the GAF domain structure of PDE10A.

Regarding PDE8, we have designed some potential inhibitors to this enzyme based on an indazole core, and we have obtained them by a new synthetic solid phase pathway based on triazene linker T1.